

Ana Paula Caldeira de Andrada Beltrame

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DE SOLUÇÕES  
EXPERIMENTAIS DE QUITOSANA FOSFORILADA, EM PH  
NEUTRO E ALCALINO, NO CONTROLE DA EROSÃO  
DENTINÁRIA**

Tese de doutorado apresentada à Banca  
Examinadora do Programa de Pós-Graduação em  
Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da  
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito  
parcial para a obtenção do título de Doutor em  
Odontologia, área de concentração Odontopediatria, sob a  
orientação da Professora Doutora Izabel Cristina Santos Almeida e  
coorientação da Professora Doutora Liliete Canes Souza.

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Caldeira de Andrada Beltrame, Ana Paula  
Avaliação in vitro da eficácia de soluções de quitosana  
fosforilada, em pH neutro e alcalino, no controle da  
erosão dentinária / Ana Paula Caldeira de Andrada Beltrame  
; orientadora, Izabel Cristina Santos Almeida ;  
coorientadora, Lilliete Canes Souza. - Florianópolis, SC,  
2016.  
92 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós  
Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Erosão dental. 3. Dentina. 4.  
Quitosana. I. Santos Almeida, Izabel Cristina. II. Canes  
Souza, Lilliete. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV.  
Título.

Ana Paula Caldeira de Andrada Beltrame

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DE SOLUÇÕES  
EXPERIMENTAIS DE QUITOSANA FOSFORILADA, EM PH  
NEUTRO E ALCALINO, NO CONTROLE DA EROSÃO  
DENTINÁRIA**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutora em Odontologia, área de concentração Odontopediatria, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 29 de abril de 2016.

---

Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Izabel Cristina Santos Almeida  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Izabel Cristina Santos Almeida  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Liliete Canes Souza  
Coorientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Miguez  
University of North Carolina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado  
Faculdade de Odontologia de Bauru  
Universidade de São Paulo (Videoconferência)

---

Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvana Batalha Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Joeci Oliveira  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico esse trabalho aos meu avós que já partiram dessa vida, mas  
deixaram muito deles em mim.

***Vô Nelson Silveira***, obrigada pelo seu exemplo  
de honestidade e sinceridade...

***Vó Ilma Silveira***, obrigada pelo seu exemplo de  
compaixão e cuidado com o próximo...

E, ***Vô Lauro Caldeira de Andrada***,  
que muito contribuiu para o avanço do  
ensino da Odontologia em Santa Catarina,  
obrigada pelo seu exemplo garra e determinação!  
Se cheguei até aqui é porque o exemplo de vocês me impulsionou!  
Estou certa de que, em algum lugar,  
vocês estão vibrando com mais essa minha conquista!



## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à **Deus**, pois reconheço que tudo o que tenho e sou vem Dele, o autor da vida, o Espírito que me impulsiona para chegar a lugares que jamais chegaria sozinha!

Ao amor da minha vida, meu esposo e melhor amigo, **Robert**! Sem você, meu amor, nada disso faria sentido... Muito obrigada pelo seu apoio e amor incondicional que me sustentou nos momentos mais difíceis dessa jornada. Só nós sabemos como foi difícil a dor da distância... Mas o nosso amor venceu e nos fortaleceu! Te amo muito!

Aos meus pais, **Graça e Mauro**, que nunca mediram esforços para eu ser uma pessoa realizada e feliz! Sou fruto da união de duas pessoas maravilhosas e sou grata por ter em mim um pouquinho de cada um... Mãe, obrigada pelo seu amor incondicional e exemplo de delicadeza, compaixão e capricho! Pai, obrigada também pelo seu amor incondicional e exemplo de garra, determinação e otimismo! Amo vocês!

À minha irmã e melhor amiga **Renata**, que sempre esteve do meu lado curtindo cada conquista e me apoiando em cada dificuldade. Amor de irmã é forte demais... E me sinto privilegiada por amar e ser amada por uma pessoa tão especial como você, mana! Obrigada por tudo, sempre!

À minha vó, **Diva**, que sempre sonhou com uma neta doutora! Se cheguei até aqui, vó, foi porque aprendi com você a jogar o jogo do contente e a lutar em busca dos meus objetivos com perseverança e otimismo! Sou sua fã!

Aos meus sogros **Bete e Gentil**, meus segundos pais, por sempre me apoiarem, rezarem por mim, torcerem por mim. Obrigada pelo carinho, pelo acolhimento e pelas inúmeras conversas que me orientaram e me ajudaram a chegar até aqui! Amo vocês!

À todos os meus familiares que me apoiaram num dos momentos mais difíceis da minha vida. Obrigada aos meus tios, primos, cunhados e sobrinhos. O incentivo e suporte de vocês foi fundamental para que eu conseguisse morar fora do país durante 18 meses e concluísse com êxito o meu doutorado! Amo vocês!

Ao meu primo, **Xande**, Design Gráfico, que nessa última semana me ajudou a preparar essa apresentação fazendo os esquemas e editando as fotos. Obrigada primo! Pelo seu talento, disponibilidade e carinho!

Aos meus amigos da Equipe Nossa Senhora Mãe de Deus: **Maria e Leandro, Adri e Marcinho, Ju e Luiz, My e Du, Milla e Léo e Carlos**, que estiveram comigo em oração durante esse tempo, me dando suporte e dando suporte também para o Robert. A ajuda de vocês foi fundamental para o fortalecimento do nosso casamento diante dessa grande provação!

Às minhas amigas da faculdade que viveram junto comigo a realização desse sonho: **Débora, Maica, Guerly, Aline e Letícia**! Obrigada por sempre torcerem por mim! Amo vocês!

À minha amiga **Renata**! Minha irmã de profissão, parceira de congressos! Se hoje cheguei até aqui foi porque você me deu o empurrão inicial! Obrigada amiga! Pelo seu carinho, torcida e amizade fiel! Amo você!

À minha amiga **Samira**, amiga de uma vida! Que bom que nos reencontramos! Obrigada pelo apoio, carinho e amizade! Você é uma amiga muito especial pra mim! Amo você!

À **Alessandra**, que me acolheu na sua casa, em Chapel Hill, durante 8 meses! Durante esse período ganhei muito mais do que um lar, mas uma amiga e uma irmã com quem pude dividir todas as angústias e alegrias dessa experiência incrível! Serei eternamente grata à você, Ale!

À família que me acolheu e me deu colo durante esse período que estive afastada dos meus: **Marion, Pedro, Sophia, Sarah e Stella**! Obrigada família querida! O carinho de vocês foi fundamental para eu chegar até aqui!

Aos meus amigos de uma vida que a providência Divina fez com que nos encontrássemos nos meus últimos meses nos EUA: **Greice e Gustavo**, com suas lindas filhas, **Antônia e Cecília**! Quando eu já estava quase que sem forças para continuar perseverando, vocês apareceram para me dar apoio e carinho e fazer com que eu quisesse ficar mais um pouquinho lá para curtir vocês!



Ao casal amigo que muito contribuiu para a realização dessa pesquisa: **Patrícia e Ricardo!** Foi um privilégio conhecer e conviver com vocês e com suas lindas filhas: **Violet e Lolie!**

Foi um privilégio também, trabalhar e aprender com vocês! Só nós sabemos quantos obstáculos tivemos que enfrentar para concluir com êxito esse trabalho... E vocês foram parceiros e perseverantes comigo até o fim! Serei eternamente grata à vocês por tudo e quero continuar trabalhando em parceria com vocês!

À minha amiga **Islam** que muito contribuiu para a realização dessa pesquisa! Sua ajuda foi além do trabalho de laboratório... Todo o apoio e incentivo que recebi de você, querida, me ajudaram a ir em frente mesmo diante de tantos desafios! Obrigada!

Aos novos amigos que tive o privilégio de conhecer na UNC e que muito contribuíram para o meu crescimento durante esse período: **Daniela, Marina, Andréa, João, Julie, Tiago, Flávia, Ricardo, Apoena, Adalberto, Letícia, Bruno, André, Jane, Luiz Pimenta, Dr. Milano e Dra. Lee, Taneet, Caroline e Taiseer.**

Aos meus amigos do coral da **Newman Church**, especialmente a **Marielina**, que me ajudaram a estar mais próxima de Deus durante todos esse tempo! Tenho certeza que isso fez toda a diferença para que eu perseverasse com fé, otimismo e tranquilidade!

Às minhas amigas **Christine e Kathy**, minhas primeiras amigas nativas da Carolina do Norte! Com elas eu aprendi muito mais do que falar inglês! Obrigada pelo apoio e amizade de vocês!

À **Victoria**, pela sua ajuda paciente e competente no Microscópio Eletrônico de Varredura! E aos químicos, **Dakota e Mark**, pela disponibilidade em nos ajudar a criar esse produto! Foi um grande desafio para mim aprender uma coisa totalmente nova ainda em outra língua! Mas a paciência e competência dessas pessoas me ajudaram a ultrapassar essa barreira!

À **Universidade da Carolina do Norte**, especialmente ao **Departamento de Dentística Operatória**, na pessoa do **Prof. André Ritter**, e todos os seus **professores e funcionários** que trabalharam direta ou indiretamente para o meu aprendizado e realização da minha pesquisa. Foi uma grande honra trabalhar por 18 meses nessa instituição que preza pela

excelência no ensino, serviço e pesquisa!

À **Universidade Federal de Santa Catarina** que me acolheu desde sempre em toda a minha formação superior e a todos os **professores, alunos, funcionários e pacientes** que contribuíram direta ou indiretamente na conclusão de mais uma importante etapa da minha carreira!

Aos professores e amigos da Odontopediatria: **Joeci, Michele, Mariane, Ricardo, Rosa e Marcos**, por acreditarem em mim e me impulsionarem nessa jornada tão desafiadora. Vocês me fazem acreditar que tudo vale a pena! Muito obrigada pelo apoio e carinho de sempre!

Aos meus queridos colegas, parceiros de trabalho e amigos: **Ricardo e Danielle**, pelo apoio, incentivo, força e carinho.  
É muito bom trabalhar com pessoas comprometidas como vocês!

À minha coorientadora querida, **Liliete**, pela dedicação e carinho desde a concepção desse trabalho... Foram horas de estudo, conversas e experiências no laboratório... Além da correria para finalizar as correções e entregar esse produto final! Tudo com muita paciência e delicadeza! Obrigada por tudo, querida! Aprendi muito com você!

À minha querida orientadora e amiga **Izabel**, que esteve presente em toda a minha formação superior! Como é difícil agradecer tudo o que você fez e faz por mim... Depois de tantos anos convivendo com você, uma pessoa com um dos maiores corações que já conheci, percebo um pouco de você em mim... E sou grata por isso! Obrigada querida, pela sua garra, força, coragem, amizade, sinceridade, bondade e carinho!  
Serei eternamente grata à você por ter me acolhido e me transformado numa pessoa melhor!

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito anti-erosivo de soluções experimentais de quitosana fosforilada, em pH neutro e alcalino, em dentina bovina. Quitosana de baixo peso molecular foi modificada numa reação com ácido metassulfônico e oxicloreto de fósforo para a obtenção de quitosana com 30% de fosforilação. Blocos de dentina radicular bovina (8 x 4 x 2 mm) foram polidos com lixas d'água: 400, 600, 1200 e diamante em suspensão: 6 µm, 3 µm, 1 µm e 0,25 µm. Os espécimes de dentina foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos (n = 8): 1- Sem tratamento (controle negativo); 2- Solução tampão PBS, pH = 7,4 (controle negativo); 3- Solução de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> (fluoreto de amina/fluoreto de sódio/cloreto de estanho - controle positivo), pH = 4,5; 4- Solução de quitosana 0,5%, pH = 7,6; 5- Solução de quitosana fosforilada 0,5%, pH = 7,0; 6- Solução de quitosana fosforilada 0,5%, pH = 11,0. Os espécimes foram submetidos durante 5 dias ao ciclo des-remineralização (des-re) seguido de tratamento: ácido cítrico 0,5%, pH = 2,3 (2 min, 6x/dia); solução remineralizadora, pH = 6,5 (30 min, após o desafio ácido e após o tratamento com as soluções controles e experimentais/12h durante a noite); tratamento (2 min, 6x/dia). A perda de estrutura de dentina foi mensurada por perfilometria e a superfície da dentina exposta ao ciclo des-re foi analisada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A maior perda de dentina foi encontrada no grupo sem tratamento (26,45±2,22 µm), seguido pelo grupo tratado com PBS (24,74±2,15 µm), quitosana (21,60±3,65 µm), quitosana fosforilada alcalina (17,82±2,18 µm), quitosana fosforilada neutra (17,76±3,30 µm) e AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> (8,63±1,94 µm). Em comparação com o grupo sem tratamento, o grupo tratado com AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> apresentou maior redução na perda de dentina (67%), seguido pelos dois grupos tratados com quitosana fosforilada (33%), quitosana (18%) e PBS (6%). A microscopia revelou preservação da integridade das fibras colágenas nos grupos tratados com AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> e quitosana fosforilada alcalina. Soluções experimentais de quitosana fosforilada apresentaram efeito limitado na redução da perda dentinária, quando comparadas com a solução fluoretada, porém, o possível efeito sobre a manutenção da integridade das fibras colágenas torna este polímero promissor na prevenção e tratamento da erosão em dentina.

**Palavras-chave:** Erosão Dental. Dentina. Quitosana.



## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the anti-erosive effect of phosphorylated chitosan experimental solutions, neutral and alkaline pH, in bovine dentin. Low molecular weight chitosan was modified in a reaction with metasilphonic acid and phosphorous oxychloride to obtain chitosan with 30% of phosphorylation. Bovine root dentin blocks (8 x 4 x 2 mm) were polished with grids: 400, 600, 1200 and diamond suspension: 6, 3, 1 and 0.25 micrometers. The dentin specimens were randomly distributed in the following groups (n = 8): 1. No treatment (negative control); 2- Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 (negative control); 3- Amine fluoride, sodium fluoride and stannous chloride (AmF / NaF / SnCl<sub>2</sub> - positive control), pH = 4.5; 4- Chitosan (0,5%), pH = 7.6; 5- Phosphorylated chitosan (0,5%), pH = 7.0; 6- Phosphorylated chitosan (0,5%), pH = 11.0. The specimens were subjected to the experimental cycle for 5 days followed by treatment: citric acid 0.5%, pH = 2.3 (2 min, 6x / day); remineralizing solution, pH 6.5 (30 min, after acid challenge and after treatment / 12h overnight); treatment (2 min, 6x / day). The loss of dentin was measured by profilometry and the surface of dentin was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The largest loss of dentin was found in the group without treatment ( $26.45 \pm 2.22 \mu\text{m}$ ) followed by PBS-treated group ( $24.74 \pm 2.15 \mu\text{m}$ ), chitosan ( $21.60 \pm 3.65 \mu\text{m}$ ), phosphorylated chitosan alkaline ( $17.82 \pm 2.18 \mu\text{m}$ ), phosphorylated chitosan neutral ( $17.76 \pm 3.30 \mu\text{m}$ ) and AmF / NaF / SnCl<sub>2</sub> ( $8.63 \pm 1.94 \mu\text{m}$ ). In comparison with the untreated group, group treated with AmF / NaF / SnCl<sub>2</sub> exhibited a greater reduction in the loss of dentin (67%), followed by the two groups treated with phosphorylated chitosan (33%), chitosan (18%) and PBS (6%). SEM showed preservation of the integrity of the collagen fibers in the groups treated with AmF / NaF / SnCl<sub>2</sub> and phosphorylated chitosan alkaline. Experimental solutions of phosphorylated chitosan had limited effect in reducing dentin loss in comparison with fluoride solution, however, the possible effect on maintaining the integrity of collagen fibers makes this promising polymer in the prevention and treatment of erosion in dentin.

**Key-words:** Dental erosion. Dentin. Chitosan.



## LISTA DE FIGURAS

### TESE

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Síntese da quitosana fosforilada – reação.....   | 42 |
| Figura 2. Síntese da quitosana fosforilada – lavagem.....  | 43 |
| Figura 3. Síntese da quitosana fosforilada – secagem.....  | 44 |
| Figura 4. Soluções: ácido cítrico, solução remineralizadora, quitosana pura, quitosana fosforilada (pH neutro e alcalino)..... | 46 |
| Figura 5. Secção dos blocos de dentina.....  | 47 |
| Figura 6. Dispositivo auxiliar no polimento dos espécimes.....   | 48 |
| Figura 7. Espécimes em cada etapa do polimento e isolamento com esmalte sintético e fita adesiva.....                          | 48 |
| Figura 8. Desenho esquemático do ciclo experimental.....   | 49 |
| Figura 9. Evidenciação da área não exposta e exposta da dentina e Perfilometria.....   | 50 |
| Figura 10. Preparo das amostras para o Microscópio Eletrônico de Varredura.....  | 51 |

### ARTIGO

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura da superfície dentinária das amostras tratadas nos diferentes grupos. A: Interface entre a área não exposta e a área exposta ao ciclo des-re (1000x, inclinação 40°); B: Área da dentina exposta (5.000x); C: Área da dentina exposta em maior magnificação (20.000x)..... | 72 |
|---|----|





## **LISTA DE TABELAS**

### **TESE**

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Análise descritiva dos dados: média em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) da perda de dentina, intervalo de confiança de 95%, mediana, variância, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo de cada grupo..... | 89 |
| Tabela 2. Teste de homogeneidade dos dados (Levene).....   | 90 |
| Tabela 3. Teste de normalidade do erro padronizado (Shapiro-Wilk)...   | 91 |
| Tabela 4. Teste de análise de variância (ANOVA One Way).....   | 91 |
| Tabela 5. Teste post-hoc de Tukey.....   | 92 |

### **ARTIGO**

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Composição das soluções controles e experimentais de acordo com o pH, o meio de dissolução e as substâncias ativas.....                                     | 69 |
| Tabela 2. Média e desvio padrão da perda de estrutura dentinária após 5 dias de ciclo des-remineralização e tratamento com as soluções controles e experimentais..... | 70 |



## **LISTA DE GRÁFICOS**

### **TESE**

|   |    |
|---|----|
| Gráfico 1. Grau de fosforilação da quitosana após 72h de reação.....  | 83 |
| Gráfico 2. Porcentagem (%) de redução da nanodureza de dentina nos diferentes grupos (Estudo piloto 1)..... | 85 |
| Gráfico 3. Perda de dentina em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) nos diferentes grupos (Estudo piloto 2).....   | 86 |
| Gráfico 4. Perda de dentina em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) nos diferentes grupos (Estudo piloto 3).....   | 87 |
| Gráfico 5. Perda de dentina em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) nos diferentes grupos (Estudo piloto 4).....   | 88 |

### **ARTIGO**

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 1. Porcentagem de redução na perda de dentina nos diferentes grupos de tratamento em relação ao grupo controle negativo..... | 71 |
|--|----|



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

pH – potencial hidrogeniônico

H<sup>+</sup> - íons hidrogênio

Ca<sup>2+</sup> - íons cálcio

PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - íons fosfato

F – flúor

NaF – fluoreto de sódio

TiF<sub>4</sub> – fluoreto de titânio

SnF<sub>2</sub> – fluoreto de estanho

AmF – fluoreto de amina

SnCl<sub>2</sub> – cloreto de estanho

MMPs – metaloproteinases de matriz

s – segundos

min – minutos

h – horas

ppm – partes por milhão

CPP-ACP – fosfopeptídeo de caseína e fosfato de cálcio amorfo

MSA (CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) – ácido metasulfônico

POCl<sub>3</sub> – oxicloreto de fósforo

C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O – éter etílico

THF (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O) – tetraidrofurano

NaOH – hidróxido de sódio

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – ácido fosfórico

KCl – cloreto de potássio

NaHCO<sub>3</sub> – bicarbonato de sódio

CaCl<sub>2</sub> – cloreto de cálcio

NaHPO<sub>4</sub> – fosfato de sódio

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – fosfato de sódio monohidratado

$\text{NaCl}$  – cloreto de sódio

$\mu\text{m}$  – micrômetros

$\text{mm}$  – milímetros

$\text{nm}$  - nanômetros

$\text{mL}$  – mililitros

v/v – volume/volume

$\text{g}$  – gramas

$\text{M}$  – molar

$\text{mM}$  - milimolar

PBS – solução tampão salina fosfato

des-re – desmineralização-remineralização

MEV – microscopia eletrônica de varredura

Qui – quitosana

Qui-F\_N – quitosana fosforilada neutra

Qui-F\_A – quitosana fosforilada alcalina

## SUMÁRIO

|  |              |
|--|--------------|
| <b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>                              | <b>25-35</b> |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                     | <b>37</b>    |
| <b>3. METODOLOGIA EXPANDIDA.....</b>                         | <b>39-51</b> |
| 3.1 Materiais.....   | 39           |
| 3.2 Métodos.....   | 41           |
| 3.2.1 Síntese da quitosana fosforilada.....                  | 41           |
| 3.2.2 Preparo das soluções.....                              | 44           |
| 3.2.3 Preparo dos espécimes de dentina.....                  | 46           |
| 3.2.4 Ciclo experimental.....                                | 48           |
| 3.2.5 Perfilometria.....                                     | 50           |
| 3.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....         | 50           |
| 3.2.7 Análise estatística.....                               | 51           |
| <b>4. ARTIGO.....</b>  | <b>53-72</b> |
| <b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                          | <b>73</b>    |
| <b>6. REFERÊNCIAS.....</b>                                   | <b>75-81</b> |
| APÊNDICE A – Caracterização da quitosana fosforilada.....    | 83           |
| APÊNDICE B – Resultados dos estudos pilotos.....             | 85-88        |
| APÊNDICE C – Análise descritiva e estatística dos dados..... | 89-92        |





# 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

## 1.1 DEFINIÇÃO E PREVALÊNCIA

Erosão dental é a perda progressiva do tecido mineral do dente devido à exposição crônica à ácidos sem o envolvimento de microrganismos (IMFELD, 1996), sendo esta a principal diferença em relação à doença cárie. Estudos em diversas populações do mundo tem confirmado uma prevalência expressiva da erosão dental, com uma variação entre 1 e 79% nas crianças de 2 a 5 anos e entre 7 e 100% nos adolescentes de 9 a 20 anos (JAEGGI & LUSSI, 2014). No Brasil, a prevalência em crianças entre 3 e 4 anos foi de aproximadamente 50% (MURAKAMI et al., 2011). Em adolescentes, esse número variou entre 7,2 e 34,1% (AUAD et al., 2007; GURGEL et al., 2011; AGUIAR et al., 2014). Os dados de incidência mostram um aumento no número de lesões erosivas entre 3,5 e 18% ao ano entre crianças e adolescentes (JAEGGI & LUSSI, 2014).

A sua etiologia é complexa e multifatorial, sendo atribuída a fatores químicos, biológicos e comportamentais. Os fatores químicos podem ser classificados em intrínsecos e extrínsecos quando provenientes do suco gástrico ou de alimentos e bebidas ácidas, respectivamente. Os parâmetros que determinam o potencial erosivo de alimentos e bebidas são: pH (potencial hidrogeniônico), acidez titulável e concentrações de cálcio, fosfato e flúor (LUSSI et al., 2012). Dentre os fatores biológicos, o principal deles é a saliva, pois ela apresenta mecanismos protetores como a dissolução dos ácidos e a formação da película adquirida (LUSSI et al., 2011). Como fatores comportamentais são citados: qualidade da alimentação; frequência, tempo, forma e horário de consumo de alimentos e bebidas ácidas; presença de doenças psicossomáticas, como por exemplo a bulimia; e ingestão de medicamentos que interferem no fluxo salivar, podem ser determinantes para o início e a progressão da erosão dental (KANZOW et al., 2016).

A dissolução acontece através da combinação entre a liberação de íons hidrogênio ( $H^+$ ) pelo ácido e a captação de íons cálcio ( $Ca^{++}$ ) da estrutura dental pelos íons do ácido carregados negativamente (ânions) (FEATHERSTONE & LUSSI, 2006). O constante desafio erosivo e a consequente desmineralização provocam um aumento na rugosidade do esmalte, similar a um condicionamento ácido, resultando num desgaste dental com perda irreversível de estrutura e redução da dureza. Com isso, o esmalte fica mais vulnerável a um desgaste ainda maior devido as forças mecânicas - atrição e abrasão - podendo atingir a dentina

(GANSS et al., 2014). Quando a dentina está exposta pode provocar sensibilidade aos estímulos frios, quentes e táteis (LUSSI et al., 2011).

Embora o esmalte e a dentina tenham a mesma composição, eles apresentam diferenças em sua estrutura. Enquanto o esmalte apresenta uma porcentagem maior de hidroxiapatita, a dentina apresenta uma maior porcentagem de proteínas e lipídios, sendo o colágeno tipo 1 a matéria orgânica mais prevalente (90%). Além disso, a hidroxiapatita que compõe a dentina apresenta mais carbonato o que torna o conteúdo mineral da dentina mais susceptível a desmineralização quando comparada ao esmalte (FEATHERSTONE & LUSSI, 2006). Esmalte e dentina também apresentam propriedades físicas diferentes. A dentina possui uma dureza menor do que o esmalte, sendo a dentina peritubular, com 40% a mais de conteúdo mineral, mais dura do que a intertubular (LUSSI et al., 2011). Embora o mecanismo de ação do desgaste erosivo na dentina ainda não tenha sido completamente esclarecido *in vivo*, sabe-se que as fibras colágenas conferem à dentina uma maior resistência às forças mecânicas e dificultam a saída dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  através da superfície desmineralizada. Portanto, a sua degradação, realizada especialmente pelas enzimas contidas na saliva e na própria dentina (metaloproteinases de matriz – MMPs), faz acelerar a progressão da perda mineral (BUZALAF et al., 2012).

A erosão dental pode interferir diretamente na qualidade de vida do indivíduo devido a mudanças na estética e/ou perda na função dos dentes fazendo com que evitem até mesmo de sorrir e falar. Em estágios avançados, com a destruição contínua da dentina, pode ocorrer além da sensibilidade, a perda da anatomia dentária e da dimensão vertical, tornando o tratamento um desafio para o dentista e demandando tempo e dinheiro do paciente (SCHLUETER et al., 2012).

## 1.2 PREVENÇÃO E TRATAMENTO

Embora a forma mais eficaz de prevenção da erosão dental seja evitar o consumo excessivo de alimentos e bebidas ácidas, é impossível evitar o contato com esses produtos durante toda a vida. Portanto, para prevenir o aparecimento e a progressão dessas lesões algumas medidas preventivas devem ser tomadas, bem como o seu diagnóstico precoce.

As medidas preventivas que estão sendo estudadas vão desde aconselhamentos alimentares, passando pela estimulação do fluxo salivar e modificação de bebidas com potencial erosivo, chegando até a identificação dos melhores produtos fluoretados e melhores formas de apresentação e regime de aplicação (MAGALHÃES et al., 2009). A

busca por um produto eficaz para o controle da erosão dental, seja ele na forma de creme dental, gel ou solução, é constante entre os pesquisadores.

### 1.2.1 Estudos em esmalte *in vitro*

Diferente da doença cárie, cremes dentais convencionais contendo 1450 ppm de flúor na forma de Fluoreto de Sódio (NaF) não apresentam eficácia contra erosão dental em esmalte (GANSS *et al.*, 2011). A redução na perda de esmalte tratado com uma combinação de diferentes íons metálicos com fluoreto ( $\text{TiF}_4$ ,  $\text{SnF}_2$ ,  $\text{AmF}$ , NaF) pode variar de 62 a 93% em diferentes regimes de aplicação (SCHLUETER *et al.*, 2009a; YU *et al.*, 2010; HOVE *et al.*, 2011; COMAR *et al.*, 2012). Comar *et al.* (2012) observaram que cremes dentais experimentais com a combinação de NaF e  $\text{SnF}_2$  (1450 ppm de F) e de NaF e  $\text{TiF}_4$  (1450 ppm de F) promoveram menor perda de esmalte (66 e 70%, respectivamente) do que os mesmos componentes sozinhos (entre 42 e 54%), num modelo experimental de erosão e abrasão: Sprite Zero® 90s 4x/dia, escovação com o creme dental 15s 2x/dia, 7 dias.

De acordo com Schlueter *et al.* (2009), quanto maior a concentração de estanho e de flúor, maior é a redução do desgaste erosivo. As soluções com 1500 ppm de NaF e 2800 ppm de  $\text{Sn}_2$  e 1000 ppm de NaF e 2100 ppm de  $\text{Sn}_2$  apresentaram redução na perda de esmalte de 89%, sem força abrasiva - ácido cítrico 5 min. 6x/dia, aplicação da solução 2 min. 2x/dia, 10 dias - enquanto que em menor concentração (1000 ppm de F, 700 ppm de  $\text{Sn}_2$ ) a taxa de eficácia foi reduzida para 58,3%. O mesmo foi observado com as soluções contendo  $\text{TiF}_4$ . O baixo valor de pH também é fundamental para a eficácia dessas substâncias no controle erosivo (YU *et al.*, 2010; HOVE *et al.*, 2011). Yu *et al.* (2010) observaram que uma única aplicação de 3 min. das soluções de  $\text{SnF}_2$  (500 ppm de F, pH 2,7) e  $\text{TiF}_4$  (500 ppm de F, pH 1,2) apresentaram menor perda de esmalte (71,6, 56,8%, respectivamente) após um desafio erosivo de 5 dias - ácido cítrico 1 min. 6x/dia - do que essas mesmas soluções com pH 4,0 (67,6 e 20,9%, respectivamente). Soluções de  $\text{TiF}_4$  (1,64%) e NaF (2,2%), ambas com pH 1,2 apresentaram redução na perda de esmalte de 72 e 49%, respectivamente - ácido cítrico 10 min. 6x/dia, aplicação da solução 5 min., 1x/dia, 5 dias (SCHLUETER *et al.*, 2007). Entretanto, uma solução de  $\text{TiF}_4$  com pH 4,5, frente a condição severa de desafio erosivo (ácido cítrico 5 min. 6x/dia, aplicação da solução 2 min. 2x/dia, 7 dias) não foi capaz de reduzir a perda de esmalte. Por outro lado, nessas mesmas condições,

uma solução contendo AmF/NaF/SnF<sub>2</sub> (1.500 ppm de F e 2.800 ppm de Sn<sub>2</sub>) foi capaz de reduzir a perda de esmalte em 93,1% (SCHLUETER et al., 2009).

### 1.2.2 Estudos em esmalte *in situ*

Estudos *in situ* também confirmam que o NaF sozinho não é capaz de controlar a erosão dental em esmalte (GANSS et al., 2010; HUYSMANS et al., 2011; SCHLUETER et al., 2013) mesmo em alta concentração, como 5000 ppm de flúor (HOVE et al., 2008). Dois cremes dentais disponíveis no mercado contendo SnF<sub>2</sub> (Meridol®, GABA – 1400 ppm de F e Pro-Expert Enamel Protection®, Oral B – 1450 ppm de F) foram capazes de reduzir a perda de esmalte em 34%, enquanto que um creme dental contendo somente NaF reduziu em 7% essa perda quando exposto a: ácido cítrico 5 min. 3x/dia, aplicação do creme dental 2 min. + 10 movimentos de escovação 2x/dia, 4 dias (HUYSMANS et al., 2011). Ganss *et al.* (2010) observaram 19% de eficácia com uma solução de NaF (500 ppm de F), enquanto que uma solução de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> (Elmex Erosion Protection®, GABA 500 ppm de F) reduziu a perda de esmalte em 67% - ácido cítrico 5 min. 6x/dia, aplicação da solução 30s 1x/dia, 5 dias. Em altas concentrações (5000 ppm de F) as soluções de SnF<sub>2</sub> e TiF<sub>4</sub> reduziram a perda de esmalte em 91 e 100%, respectivamente, numa condição de desafio erosivo: ácido hidrocloreídrico 2 min. 2x/dia, aplicação da solução 2 min. 1x a cada 3 dias, 9 dias. A solução com NaF, 5000 ppm de F, não foi capaz de promover redução significativa comparada ao controle negativo (HOVE et al., 2008). Porém uma solução com a combinação de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> em alta concentração (1000 ppm de F e 1900 ppm de Sn<sub>2</sub>) conseguiu reduzir a perda de esmalte em 72,6% em uma condição severa de desafio erosivo (ácido cítrico 5min. 6x/dia, bochecho com a solução 30s 1x/dia, 7 dias), confirmando a melhor eficácia dos produtos fluoretados combinados com íons metálicos (SCHLUETER et al., 2009b).

### 1.2.3 Estudos em dentina *in vitro*

Assim como no esmalte, estudos *in vitro* em dentina demonstram maior eficácia dos produtos fluoretados combinados com íons metálicos e baixo valor de pH (SCHLUETER et al., 2007; GANSS et al., 2010; COMAR et al., 2012). Soluções de TiF<sub>4</sub> (1,64%) e NaF

(2,2%), ambas com pH 1,2, apresentaram redução na perda de dentina de 74,7 e 64,3%, respectivamente (ácido cítrico 10 min. 6x/dia, aplicação da solução 5 min., 1x/dia, 5 dias) (SCHLUETER et al., 2007). Cremes dentais experimentais com a combinação de NaF e SnF<sub>2</sub> (1450 ppm de F), NaF e TiF<sub>4</sub> (1450 ppm de F), TiF<sub>4</sub> (1450 ppm de F) e SnF<sub>2</sub> (1450 ppm de F) promoveram uma redução significativa na perda de dentina variando entre 63,8 e 78,7% num modelo de erosão e abrasão (Sprite Zero® 90s 4x/dia, escovação com o creme dental 15s 2x/dia, 7 dias) (COMAR et al., 2012).

Alguns produtos disponíveis no mercado apresentaram uma redução menos expressiva na perda dentinária quando testados com diferentes regimes de aplicação (MAGALHÃES et al., 2012; PASSOS et al., 2014). Uma única aplicação de vernizes a base de NaF (Duraphat®, Colgate – 2,6% de F, Duofluorid®, FGM – 5,63% de F e verniz experimental – 2,45% de F) mostraram uma redução semelhante na perda de dentina de aproximadamente 40% após um regime erosivo (Coca-cola® 90s 4x/dia, escovação com creme dental não fluoretado 10s 2x/dia) (MAGALHÃES et al., 2012). Após um regime erosivo/abrasivo, o creme dental Elmex®, GABA (AmF - 1400 ppm F) não foi capaz de reduzir expressivamente o desgaste erosivo da dentina. Já os cremes dentais Meridol®, GABA (AmF/SnF<sub>2</sub> - 1400 ppm) e Crest Pro-Health Enamel Shield®, Crest (SnF<sub>2</sub> – 1100 ppm) mostraram uma redução na perda de dentina de 68,3 e 48,8%, respectivamente (ácido hidrocloreídrico 60s 3x /dia, escovação com creme dental – 150 movimentos – 3x/dia, 5 dias) (PASSOS et al., 2014).

Um dos maiores desafios no controle do processo erosivo em dentina está na manutenção de sua matriz orgânica que, quando removida continuamente, acelera significativamente a perda de estrutura. Ganss *et al.* (2010a), observaram que soluções de SnCl<sub>2</sub> (815 ppm de Sn<sub>2</sub>), NaF (250 ppm de F), SnF<sub>2</sub> (250 ppm de F e 809 ppm de Sn), AmF (250 ppm de F), AmF/NaF (250 ppm de F) e AmF/SnF<sub>2</sub> (250 ppm de F e 409 ppm de Sn) apresentaram significativa redução na perda de dentina, que variou entre 52 e 89% com a remoção da matriz orgânica dentinária ao final do regime erosivo (ácido cítrico 2 min. 6x/dia, aplicação da solução 2 min. 6x/dia, 10 dias). Porém, quando a matriz orgânica foi removida continuamente durante os 10 dias de regime erosivo, houve redução significativa na perda de dentina (de 11% a 78%). A menor redução aconteceu nos grupos do SnF<sub>2</sub> (89-78%) e do AmF/SnF<sub>2</sub> (74-67%) (GANSSE et al., 2010a).

### 1.2.4 Estudos em dentina *in situ*

Os estudos *in situ* em dentina demonstram uma eficácia menor dos produtos fluoretados (MAGALHÃES et al., 2008), mesmo aqueles com associação de metais (SCHLUETER et al., 2009b; GANSS et al., 2010a), quando comparados aos estudos *in vitro*. Isso pode ser explicado pela presença das MMPs na saliva e na própria dentina que degradam a matriz orgânica dentinária continuamente durante o processo erosivo (BUZALAF et al., 2012). Cremes dentais que contém como substância ativa somente o NaF demonstraram pouca eficiência na redução da perda dentinária tanto na concentração de 1100 ppm de flúor (24,9%) quanto na concentração de 5000 ppm de flúor (25,9%) num modelo de desafio erosivo e abrasivo (Coca-cola® 60s 4x/dia, escovação com creme dental 30s 4x/dia) (MAGALHÃES et al., 2008).

Soluções experimentais de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> com alta concentração (1000 ppm de F e 1900 ppm de Sn<sup>2+</sup>) (SCHLUETER et al., 2009b) e menor concentração (500 ppm de F e 800 ppm de Sn) (GANSS et al., 2010a) foram capazes de reduzir a perda de dentina em 50 e 47%, respectivamente, frente a desafio severo de erosão (ácido cítrico 5 min. 6x/dia, bochecho com a solução 30s 1x/dia, 7 dias).

### 1.2.5 Estudos em esmalte e dentina *in vitro* e *in situ*

Os estudos *in vitro* que realizaram o regime erosivo tanto em esmalte como em dentina, apontam eficácia semelhante dos produtos fluoretados associados com íons metálicos nos dois tecidos dentais (SCHLUETER et al., 2007; COMAR et al., 2012). Solução de TiF<sub>4</sub> (1450 ppm de F) com baixo valor de pH (1,2) mostrou eficácia na redução da perda de esmalte e dentina em 72 e 74,7%, respectivamente, em condições severas de desafio erosivo *in vitro* (ácido cítrico 10 min. 6x/dia, aplicação do produto 5 min. 1x/dia, 5 dias) (SCHLUETER et al., 2007). Quando com pH mais elevado (3,9 e 4,4) não houve diferença na eficácia de cremes dentais experimentais contendo NaF/SnF<sub>2</sub> e NaF/TiF<sub>4</sub> (1450 ppm de F), respectivamente, quando o seu efeito foi comparado entre esmalte e dentina. O creme dental com NaF/SnF<sub>2</sub> demonstrou eficácia de 66% em esmalte e 63,8% em dentina, enquanto que o creme dental com NaF/TiF<sub>4</sub> demonstrou eficácia de 70% em esmalte e 78,7% em dentina em um modelo de desgaste erosivo e abrasivo do esmalte (Sprite Zero® 90s 4x/dia, escovação com o creme dental 15s 2x/dia, 7 dias) (COMAR et al., 2012).

Diferente dos estudos *in vitro*, estudos *in situ* não mostraram a mesma eficácia em esmalte e dentina quando submetidos ao mesmo desafio erosivo e tratados com o mesmo composto ativo (SCHLUETER et al., 2009b; GANSS et al., 2010a). No estudo de Schlueter et al. (2009b), a combinação de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> (1000 ppm de F e 1900 ppm de Sn) em solução reduziu a perda de esmalte em 72,6% e a perda de dentina em 50% frente a desafio erosivo severo *in situ* (ácido cítrico 5min. 6x/dia, bochecho com a solução 30s 1x/dia, 7 dias). Nas mesmas condições de desafio erosivo e solução, porém numa menor concentração (500 ppm de F), a redução da perda de esmalte e dentina foi de 67 e 47%, respectivamente (GANSS et al., 2010a).

### 1.3 TOXICIDADE

Embora os efeitos benéficos do flúor, tanto na água de abastecimento quanto nos produtos odontológicos, já tenha sido comprovado por inúmeros estudos, a preocupação com a sua toxicidade é constante, especialmente nas crianças. Wong et al. (2010), em uma revisão sistemática e meta-análise, observaram uma forte evidência de que o início da escovação com creme dental fluoretado antes do 2º ano de vida pode aumentar significativamente o risco de fluorose (moderada a grave). Além disso, alguns estudos mostram que a exposição excessiva ao flúor pode causar problemas que vão além da fluorose dentária, atingindo outros sistemas do corpo como: ossos, fígado, rins, trato gastrointestinal, e cérebro (CHOI et al., 2012; PERUMAL et al., 2013). Outra preocupação constante é a respeito da toxicidade aguda do flúor. As fontes mais comuns de sobre-exposições agudas são os produtos dentais, particularmente os dentífrícios, devido a sua alta concentração de flúor, sabores agradáveis, e sua presença em locais não seguros na maioria dos lares (WHITFORD, 2011).

Embora existam poucos estudos e algumas controvérsias sobre a citotoxicidade dos componentes metálicos associados ao flúor, estes também merecem atenção especial quando estamos falando do uso desses produtos por crianças, as quais podem ingerir os cremes dentais e/ou os enxaguatórios bucais contendo essas substâncias. Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* (em animais) comprovaram um certo grau de citotoxicidade do SnCl<sub>2</sub> no sistema nervoso central (SILVA et al., 2002), do SnF<sub>2</sub> nos rins, fígado e incisivos (LIM et al., 1975) e TiF<sub>4</sub> nos fibroblastos (SEN et al., 1998).

## 1.4 ALTERNATIVAS AO FLÚOR

Em revisão de literatura, Buzalaf *et al.* (2014) sugerem o uso de adesivos e selantes como alternativas para o flúor no tratamento da erosão dentária, que requerem aplicação profissional e a reaplicação periódica desses produtos. No campo dos produtos odontológicos para uso domiciliar, produtos contendo cálcio e fosfato, como o fosfosilicato de cálcio (NovaMin® NovaMin Technology Inc. Alachua, FL, USA) ou o CPP-ACP (fosfopeptídeo de caseína e fosfato de cálcio amorfo) podem ser uma alternativa, mas requerem mais estudos pois apresentam resultados controversos (BUZALAF *et al.*, 2014).

Após desafio erosivo e abrasivo em esmalte e dentina (aplicação do produto 3 min, ácido cítrico 10 min., escovação com creme dental não fluoretado - 200 movimentos, saliva artificial 2 h, 10 ciclos), o creme dental Tooth Mousse®, com CPP-ACP, demonstrou redução da perda de estrutura de esmalte e dentina em 63,79% e 79,00%, respectivamente (RANJITKAR *et al.*, 2009). Contudo, outros estudos não mostraram essa mesma efetividade com o CPP-ACP (WANG *et al.*, 2014), mesmo na presença de flúor (300 a 900 ppm) (WANG *et al.*, 2011; RALLAN *et al.*, 2013; SOMANI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; WIEGAND & ATTIN, 2014). No estudo de Rallan *et al.* (2013) houve aumento da microdureza em esmalte que sofreu desgaste erosivo (Coca-cola® 5s, saliva artificial 5s, 10 ciclos) após remineralização com uma única aplicação de 3 min. com CPP-ACP e CPP-ACP + flúor (900 ppm) de 20,58% e 36,01%, respectivamente. Resultado semelhante foi observado por Somani *et al.* (2014) após desafio erosivo (14 min. bebida carbonada) a aplicação desses mesmos produtos por 3 min./dia durante 7 dias. Creme dental com CPP-ACP e CPP-ACP + flúor (900 ppm) foi capaz de aumentar a microdureza do esmalte em 30,52 e 38,98%, respectivamente. Quando a perda de microdureza do esmalte foi comparada com o grupo controle (sem tratamento), o creme dental contendo CPP-ACP diminuiu a perda de microdureza do esmalte em 13,54% (aplicação do produto 3 min. 4x/12h, Coca-cola® 8 min. 4x/12h) (WANG *et al.*, 2014). Na avaliação da perda de estrutura de esmalte – perfilometria - por desgaste erosivo (ácido cítrico 1 min.), uma única imersão (10 min.) em solução de caseína com 300 ppm de flúor mostrou 52,71% de eficácia, enquanto que a mesma solução sem flúor mostrou eficácia de 21,32%, indicando a importância do flúor na associação com essa proteína (WHITE *et al.*, 2011).



Estudos *in situ* com CPP-ACP, na remineralização de perda de estrutura mineral, também são contraditórios. No estudo de (SRINIVASAN et al., 2010) os cremes dentais com CPP-ACP e CPP-ACP + 900 ppm de fluor aumentaram a microdureza do esmalte em 46,24% e 64, 25%, respectivamente - imersão única em bebida tipo cola 8 min., aplicação do produto 3 min. 1x/dia, 2 dias. Outros estudos *in situ*, contudo, não conseguiram comprovar essa mesma eficácia (WEGEHAUPT et al., 2012; WIEGAND & ATTIN, 2014). De acordo com Wiegand e Attin (2014) nem o leite e nem o creme dental com CPP-ACP foram capazes de reduzir o desgaste erosivo *in situ* (Sprite® 90s 6x/dia, ingestão de leite 2 min. 2x/dia ou aplicação do creme dental 3 min. 1x/dia e escovação com creme dental não fluoretado 30s 2x/dia, 5 dias) em esmalte e dentina mesmo na presença de flúor (Leite com 5 ppm de F, CPP-ACP com 900 ppm de F).

Os cremes dentais com fosfosilicato de cálcio apresentaram efeito anti erosivo semelhante ao creme dental convencional (1100 ppm de NaF) e aos cremes dentais com CPP-ACP, e não demonstraram recuperação da microdureza do esmalte erodido mesmo na presença de flúor (WANG et al., 2011; TURSSI et al., 2011).

#### **1.4.1 Apresentação da quitosana**

Em virtude da não eficácia dos produtos apresentados anteriormente, na completa redução da perda de estrutura de esmalte e de dentina frente aos desafios erosivos, a busca por um outro agente é necessária. A quitosana é um polímero orgânico 100% natural, de baixo custo, atóxico, biocompatível, obtido da quitina de carapaças de crustáceos, insetos e fungos, muito utilizada na medicina, agricultura, nutrição, farmácia e proteção ambiental (RAVI KUMAR, 2000). Apresenta propriedades anti-oxidantes, anti-inflamatórias, anti-microbianas, cicatrizantes e de inibição de formação de biofilmes que torna o seu uso interessante também na Odontologia (SANO et al., 2003; BAE et al., 2006). Além disso, estudos comprovam que a quitosana é capaz de se aderir à superfície da hidroxiapatita prevenindo o desgaste erosivo (LEE et al., 2012) e a perda de íons fosfato sem, contudo, contribuir para a remineralização de lesões já existentes (ARNAUD et al., 2010). Por outro lado, o estudo de Keegan *et al.* (2012), com micropartículas de quitosana contendo fluoreto de sódio, mostrou propriedade bioadesiva em mucosa esofágica de suíno e liberação lenta de flúor por um período de até 6 horas, característica que

faz com que esse produto possa atuar na remineralização de lesões erosivas.

Existem no mercado dois cremes dentais com proposta anti-erosiva contendo quitosana: Chitodent® e Elmex Erosion Protection®. O estudo de Ganss *et al.* (2012) demonstrou que, após 10 dias de desafio erosivo e abrasivo *in vitro* (ácido cítrico 2 min. 6x/dia, aplicação do creme dental 2 min. + escovação 15s 2x/dia), o Elmex Erosion Protection® (AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> – 1400 ppm de F, 3500 ppm de SnCl<sub>2</sub> + quitosana) foi capaz de reduzir a perda de esmalte em 67,3%, enquanto que um creme dental contendo os mesmos componentes com exceção da quitosana reduziu a perda de esmalte em somente 38,6%. Estudo semelhante com o creme dental contendo somente quitosana em sua composição (Chitodent®) reduziu a perda de esmalte de forma menos expressiva (16,86%) (GANSS *et al.*, 2011). Estudos *in situ* - ácido cítrico 2 min. 6x/dia, aplicação do creme dental 2 min. + escovação 5s 2x/dia, 7 dias - revelaram uma redução na perda da estrutura de esmalte de 52,5% (SCHLUETER *et al.*, 2013) e 45,8% (SCHLUETER *et al.*, 2014) após a utilização desse creme dental contendo flúor e quitosana. Apesar dos resultados das pesquisas *in situ* serem menos expressivos do que os resultados *in vitro*, ambos os estudos concluíram que a presença da quitosana melhorou significativamente a eficácia do produto (SCHLUETER *et al.*, 2013; SCHLUETER *et al.*, 2014).

Os estudos que avaliaram o efeito anti-erosivo dos cremes dentais a base de quitosana em dentina mostram resultados contraditórios (AYKUT-YETKINER *et al.*, 2014; GANSS *et al.*, 2014a). Aykut-Yetkiner *et al.* (2014) observaram porcentagem de redução da perda dentinária de 60,7 e 66,6%, respectivamente, quando os cremes dentais contendo somente quitosana e quitosana mais AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> foram utilizados num modelo de desafio erosivo e abrasivo *in vitro* - ácido cítrico – pH 2,5 – 30s 6x/dia, escovação 15s 2x/dia, 6 dias. Ambos apresentaram resultados mais expressivos do que o creme dental contendo AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> sem quitosana, mostrando que a quitosana contribui para o efeito anti-erosivo em dentina. Entretanto, quando o desafio ácido foi promovido por um ácido mais forte, o ácido hidrocloreídrico (pH 1,6), a eficácia de todos os cremes dentais foi menor, variando entre 20 e 40%. Um outro estudo em dentina, contudo, apontou 18-20% de redução na perda dentinária com o creme dental contendo AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> e quitosana em desafio erosivo e abrasivo na presença e na ausência de matriz orgânica, sendo similar ao efeito de cremes dentais experimentais contendo somente NaF ou SnF<sub>2</sub> (GANSS *et al.*, 2014a). Resumindo, pesquisas têm demonstrado um maior efeito

anti-erosivo da quitosana quando associada ao flúor e íons metálicos. Além disso, a sua eficácia em dentina, mesmo quando associada ao flúor, ainda apresenta limitações.

#### **1.4.2 Apresentação da quitosana fosforilada**

A modificação da molécula de quitosana através da adição de íons fósforo foi descrita inicialmente em 1984 a fim de torná-la solúvel em água (NISHI et al., 1984). Além da solubilidade em pH neutro, a quitosana fosforilada apresenta, como vantagem à quitosana pura, uma maior capacidade de quelar íons cálcio devido aos grupos fosfato (YOKOGAWA et al., 1997), também apresentando propriedades de biocompatibilidade e osteoindução (WANG et al., 2002). Estudos recentes, avaliaram a sua capacidade de atuar na remineralização do esmalte (ZHANG et al., 2014) e da dentina (XU et al., 2011). Zhang *et al.* (2014), mostraram a habilidade desse polímero em formar nanopartículas com fosfato de cálcio amorfo (<50nm), proporcionando um padrão de remineralização mais semelhante ao esmalte hígido do que o flúor. Em dentina, a quitosana fosforilada foi capaz de modificar a dentina desmineralizada favorecendo assim a deposição de íons cálcio e fosfato (XU et al., 2011).

Considerando a prevalência expressiva da erosão dental, especialmente em crianças e adolescentes e a falta de um produto eficaz na completa redução da perda de estrutura de esmalte e dentina, percebe-se a necessidade de estudar alternativas para o tratamento da erosão dental para que essa doença possa ser prevenida e tratada de forma efetiva e segura.

Tendo em vista que a dentina apresenta um desafio maior no controle da erosão, devido ao seu conteúdo orgânico, optou-se por trabalhar com esse substrato neste estudo. Portanto, a hipótese desse estudo é que soluções de quitosana fosforilada podem atuar de forma eficaz na redução da perda de estrutura dentinária frente a um desafio erosivo.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito anti-erosivo de soluções experimentais de quitosana fosforilada, em pH neutro e alcalino, em dentina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar quantitativamente, por meio da perfilometria, a perda de estrutura dentinária, após ciclo des-remineralização seguido de tratamento com quitosana fosforilada, comparando com soluções controles.
- 2) Analisar qualitativamente, por meio da microscopia eletrônica de varredura, a superfície da dentina, após ciclo des-remineralização seguido de tratamento com as diferentes soluções a fim de ilustrar o possível efeito do tratamento na superfície da dentina.



### 3 METODOLOGIA EXPANDIDA

A metodologia a seguir descreve o desenvolvimento de soluções de quitosana fosforilada, em pH neutro e alcalino, produzidas para serem utilizadas como tratamento em um ciclo des-remineralização em dentina bovina, com subsequente avaliação da perda de estrutura dentinária por meio de perfilometria e microscopia eletrônica de varredura.

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Síntese da quitosana fosforilada

Os seguintes reagentes e equipamentos foram utilizados na síntese da quitosana fosforilada: quitosana de baixo peso molecular (448869, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), ácido metassulfônico (MSA -  $\text{CH}_3\text{SO}_3$  - 471356, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), oxicloreto de fósforo ( $\text{POCl}_3$  - 201170, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), éter etílico ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$  - E138-500, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), tetraidrofurano (THF -  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$  - T425-4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), etanol (A-405, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), agitador magnético (R05 Power, IKA® Works, Wilmington, NC, EUA), balança de precisão (AG204 Delta Range, Mettler Toledo, Columbus, OH, EUA), tubos de polipropileno de 50 mL (VWR®, Radnor, PA, EUA), centrífuga Sorvall Legend X1R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), ultrassom Branson 1210 (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, EUA), dessecador (Thermo Scientific Lab-Line, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

##### 3.1.2 Preparo das soluções

Os seguintes reagentes e equipamentos foram utilizados no preparo das soluções: NaOH (S78605, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), ácido cítrico (A-940, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (7664-38-2, Acros Organics®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), cloreto de potássio (KCl) (6858, Mallinckrodt AR®, St. Louis, MO, EUA), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) (SX0320-3, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (C79-500, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), fosfato de sódio ( $\text{NaHPO}_4$ ) (S-374, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA),

fosfato de sódio monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (S9638, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) (7581-06, Mallinckrodt AR<sup>®</sup>, St. Louis, MO), quitosana de baixo peso molecular (448869, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), quitosana fosforilada, solução de fluoreto de amina ( $\text{AmF}$ ), fluoreto de sódio ( $\text{NaF}$ ) e cloreto de estanho ( $\text{SnCl}_2$ ) (Elmex<sup>®</sup> Erosion Protection, Gaba International AG, Therwil, Suíça), balança de precisão (PB 302, Mettler Toledo, Columbus, OH, EUA), agitador magnético (Thermix<sup>®</sup> Stirring Hot Plate Model 310T, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), pHmetro digital (Education Line EL20, Mettler Toledo, Columbus, OH, EUA).

### 3.1.3 Preparo das amostras de dentina e ciclo experimental

Os seguintes materiais e equipamentos foram utilizados no preparo das amostras de dentina: solução de timol a 0,1% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), ponta diamantada (CA 774, KG Sorensen<sup>®</sup>, Cotia, SP, Brasil), cera pegajosa Kota (Kota Ind. e Com. Ltda., São Paulo, Brasil), disco diamantado dupla face (Buehler<sup>®</sup>, Lake Bluff, IL, EUA), Super Bonder (Loctite<sup>®</sup> Brand, Westlake, OH, EUA), discos de aço inoxidável de 15 mm de diâmetro (PELCO<sup>®</sup>, Ted Pella. Inc., Redding, CA, EUA), lixas d'água de granulação 400, 600 e 1200 (3M<sup>®</sup>, St. Paul, MN, EUA), discos de feltro (Leco<sup>®</sup> Corporation, St. Joseph, MI, EUA), diamante em suspensão nas granulações: 6  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  e 0,25  $\mu\text{m}$  (Leco<sup>®</sup> Corporation, St. Joseph, MI, EUA), máquina de corte Isomet 1000 (Buehler<sup>®</sup>, Lake Bluff, IL, EUA), dispositivo para fixação das amostras (Modelo 150, South Bay Technology, San Clemente, CA, EUA), máquina de polimento Ecomet 3 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), ultrassom (EMC<sup>®</sup>, Santa Fe Springs, CA, EUA). Para o ciclo experimental foi utilizada uma incubadora (C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA).

### 3.1.4 Perfilometria e Microscopia eletrônica de varredura

Na avaliação perfilométrica foi utilizado o perfilômetro digital de contato (P6 KLA Tencor, San Jose, CA, EUA) e o software Apex (KLA Tencor, San Jose, CA, EUA). Na análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizados os seguintes equipamentos: processador Leica EM TP (Leica Microsystems, Inc., Buffalo Grove, IL, EUA), secador de ponto crítico Samdri-795 (Tousimis Research Corporation, Rockville, MD), liga de ouro-paládio



(60Au: 40Pd, Hummer X Sputter Coater, Anatech USA, Union City, CA, EUA), microscópio eletrônico de varredura Zeiss Supra 25 e software Zeiss SmartSEM (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Peabody, MA, EUA).

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Síntese da quitosana fosforilada

#### 3.2.1.1 Reação

A quitosana de baixo peso molecular foi solubilizada com MSA (30 mg/1 mL) aos poucos, em balão de fundo redondo, empregando agitação magnética e sob temperatura ambiente (Figura 1A). O MSA é um ácido orgânico, sem a presença de água, capaz de solubilizar a quitosana. Foram preparadas soluções com volume final de 100 mL.

Após a completa solubilização da quitosana foi adicionado  $\text{POCl}_3$  (1,030 mL/100 mg de quitosana), nas mesmas condições de agitação e temperatura.

A solução foi mantida sob agitação magnética por 72h, possibilitando a reação de substituição dos íons hidroxila primários e secundários na molécula de quitosana por íons fosfato. O balão foi mantido tampado, para não haver contato do fósforo com a água que existe no ar, evitando a formação ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (Figura 1B).

Para finalizar a reação, foi adicionada à solução água reagente tipo I (700  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ /1,03 mL de  $\text{POCl}_3$ ) (Figura 1C). A adição de água provoca a formação de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) sendo esperado o aparecimento de bolhas e vapor (Figura 1D).

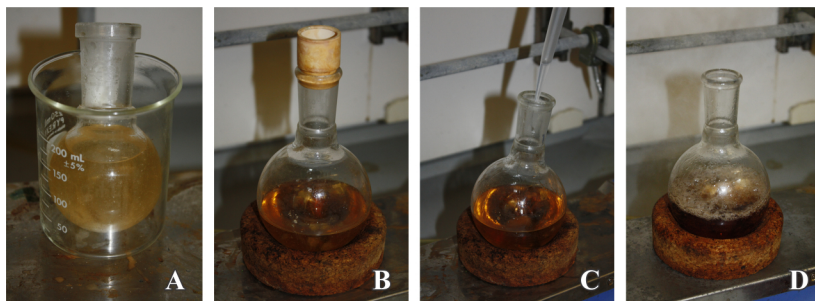


Figura 1 – Síntese da quitosana fosforilada - reação

### 3.2.1.2 Lavagem

Para o processo de lavagem, 5 a 6 mL da solução foram distribuídos em tubos de polipropileno de 50 mL. Foi adicionado 50% de éter etílico e THF na proporção de 1:1 (v/v) até preencher os tubos (entre 45 e 50 mL).

Esses solventes orgânicos não possuem a capacidade de dissolver a quitosana, porém permitem a remoção do  $\text{POCl}_3$  e do MSA que não reagiram. Os tubos foram agitados manualmente (Figura 2A), sonicados por 5 minutos (Figura 2B) e logo depois centrifugados a 5.500 rotações por minuto (rpm), com uma força de 3.517 g, durante 2 minutos à 25°C (Figura 2C).

Após a centrifugação obteve-se a quitosana fosforilada na forma sólida precipitada (Figura 2D). O solvente foi então descartado em frasco apropriado, tomando-se o cuidado para não descartar a porção sólida. Na sequência, foram adicionados 30 mL de THF aos tubos de polipropileno. Após agitação manual e sonicação, a solução foi novamente centrifugada como descrito anteriormente. O excesso de THF foi descartado, reservou-se somente a porção sólida precipitada, que contém a quitosana fosforilada.

Para finalizar o processo de lavagem adicionou-se THF e etanol puro nas proporções de 70 e 30%, respectivamente, até completar o volume de 30 mL. A solução foi novamente agitada manualmente e sonicada por 5 minutos. Na sequência, a solução foi mais uma vez centrifugada e o excesso dos solventes descartados. Após esta terceira lavagem a porção sólida torna-se passível de ser facilmente quebrada com uma espátula metálica, tornando-se pó.

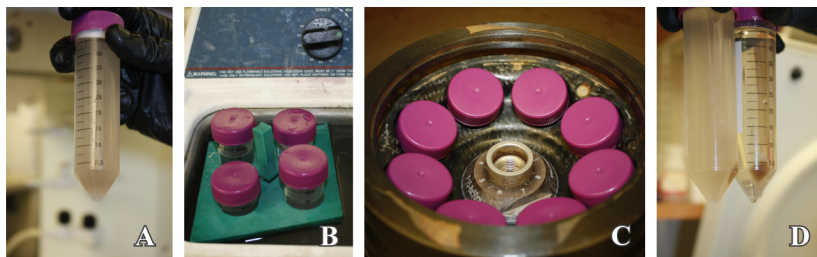


Figura 2 – Síntese da quitosana fosforilada - lavagem

### 3.2.1.3 Secagem

Todos os tubos de polipropileno, com as tampas levemente encaixadas, foram colocados num dessecador de baixa pressão, por 24 horas, para remover os resíduos de solvente e água da quitosana fosforilada (Figura 3A).

Após as 24 h, a quitosana fosforilada foi removida dos tubos de polipropileno, com o auxílio de uma espátula, e sua massa foi determinada numa balança de precisão (Figura 3B). Para a síntese de 2,25 g de quitosana com 30% de fosforilação foi necessário cerca de 3 vezes esta massa em quitosana de baixo peso molecular (aproximadamente 6,75 g). A caracterização da quitosana fosforilada quanto ao peso molecular e ao grau de fosforilação encontra-se no apêndice A.



Figura 3 – Síntese da quitosana fosforilada - secagem

### 3.2.2 Preparo das soluções

#### 3.2.2.1 Solução de NaOH

Para o ajuste do pH das diversas soluções, 10 g de NaOH foi solubilizado em 250 mL de água destilada, sob agitação, obtendo-se uma solução de NaOH 1M.

#### 3.2.2.2 Ácido cítrico

Ácido cítrico 0,5 % foi preparado por meio da solubilização, sob agitação, de 5,0 g de ácido cítrico em 1000 mL de água destilada. O valor de pH foi aferido com um pHmetro digital calibrado sendo igual a 2,3 (Figura 4A).

#### 3.2.2.3 Solução remineralizadora

Para o preparo da solução remineralizadora foram solubilizados os seguintes compostos: 0,4 mL de ácido fosfórico em 40 mL de água destilada; 1,5 g de cloreto de potássio em 100 mL de água destilada; 1,0 g de bicarbonato de sódio em 100 mL de água destilada e 0,2 g de cloreto de cálcio em 100 mL de água destilada. Na sequência, todas estas soluções foram adicionadas a 600 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 6,5 com alíquotas de NaOH 1 M e água destilada foi

adicionada até completar 1000 mL (GERRARD & WINTER 1986) (Figura 4B).

#### **3.2.2.4 Solução tampão salina fosfato (PBS)**

Uma solução de PBS 10 mM foi preparada para ser utilizada na dissolução da quitosana e da quitosana fosforilada da seguinte forma: 1,136 g de fosfato de sódio, 0,262 g de fosfato de sódio monohidratado e 7,482 g de cloreto de sódio foram solubilizados em 500 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7.4 com alíquotas de NaOH 1M e o volume completado a 1000 mL com água destilada.

#### **3.2.2.5 Solução de quitosana (pH neutro)**

Uma solução de quitosana pura 0,5% (sem fosforilação) foi preparada adicionando-se 0,5 g de quitosana em 100 mL de PBS. O pH foi aferido, apresentando o valor de 7,6. Essa solução ficou parcialmente solubilizada, pois a quitosana pura é solúvel somente em pH ácido (Figura 4C).

#### **3.2.2.6 Solução de quitosana fosforilada (pH neutro)**

Para o preparo da solução de quitosana fosforilada 0,5%, 0,5 g de quitosana fosforilada foram solubilizados em 50 mL de PBS. O pH foi ajustado para 7.0 com alíquotas de NaOH 1 M e PBS foi adicionado até completar 100 mL (Figura 4D).

#### **3.2.2.7 Solução de quitosana fosforilada (pH alcalino)**

A quitosana fosforilada foi preparada como descrito acima, diferindo apenas no pH que foi ajustado para 11.0 (Figura 4E).

#### **3.2.2.8 Solução de fluoreto de amina, fluoreto de sódio e cloreto de estanho (AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub>)**

Para servir de controle positivo, foi utilizada uma solução para bochecho disponível no mercado (Elmex<sup>®</sup> Erosion Protection, Gaba International AG, Therwil, Suíça) com as seguintes especificações: Fluoreto de amina (AmF) com 125 ppm de F, Fluoreto de sódio (NaF) com 375 ppm de F, Cloreto de estanho (SnCl<sub>2</sub>) com 800 ppm de estanho, pH 4.5.

Todas as soluções foram preparadas no dia anterior ao início do experimento, com exceção da solução remineralizadora e do ácido cítrico que foram preparados no dia do experimento.

As soluções de PBS, quitosana, quitosana fosforilada, em ambos os pHs, e a solução de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub>, foram separadas em cinco frascos de polipropileno contendo a quantidade suficiente para um dia de experimento e posteriormente congeladas.

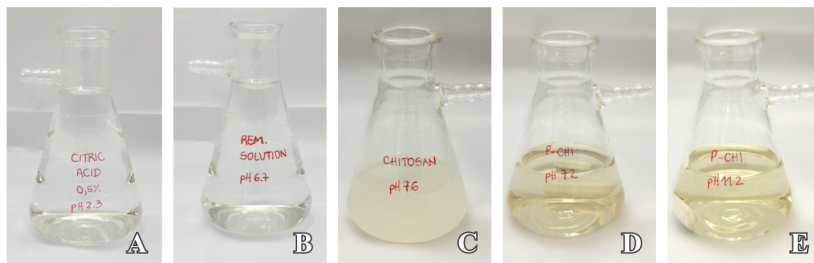


Figura 4 – Soluções: ácido cítrico, solução remineralizadora, quitosana pura, quitosana fosforilada (pH neutro e alcalino)

### 3.2.3 Preparo dos espécimes de dentina

#### 3.2.3.1 Seleção dos dentes

Para a realização deste estudo foram utilizados 24 incisivos bovinos, extraídos em frigorífico autorizado, de animais da raça nelore com 36 meses. Os restos de ligamento periodontal foram removidos com o instrumental Le Cron e profilaxia com pedra pomes e água. Estes dentes foram submetidos a uma seleção inicial com lupa 100x e iluminação artificial. Foram excluídos aqueles elementos que apresentaram falhas grosseiras, como trincas, fraturas, falhas na formação da dentina radicular. Os dentes foram armazenados em solução de timol a 0,1% sob refrigeração, até o momento da utilização. As coroas foram removidas através do seccionamento, na porção cervical dos dentes, com auxílio de ponta diamantada montada em caneta de alta rotação, sob refrigeração de água (Figura 5A).

### 3.2.3.2 Obtenção dos blocos de dentina

As raízes foram fixadas com cera pegajosa em placas de acrílico cristal. As placas de acrílico foram acopladas ao dispositivo metálico padrão da máquina de corte Isomet 1000 e os cortes foram realizados por disco diamantado dupla face (Figura 5B). Foram confeccionados quatro cortes longitudinais (separando a raiz em duas metades, mesial e distal) e dois cortes transversais, obtendo-se dois blocos por dente, do terço coronal da raiz, com dimensões de 8 mm x 4 mm x 2mm (Figura 5C).

Foi realizada uma segunda seleção dos blocos, na qual foram descartados aqueles que apresentaram defeitos como trincas, fraturas e falhas. Os blocos foram colados com Super Bonder em discos de aço inoxidável de 15 mm de diâmetro (Figura 5D) e armazenados individualmente em frascos de vidro com tampa em água deionizada à temperatura ambiente.

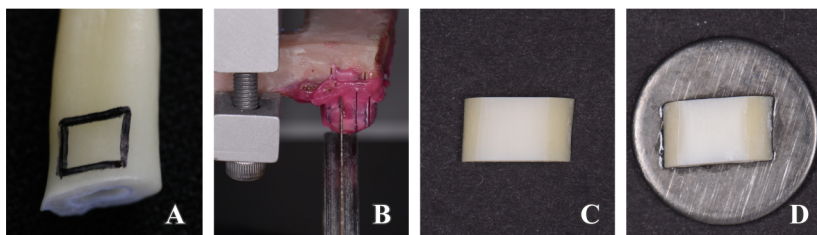


Figura 5 – Secção dos blocos de dentina

### 3.2.3.3 Polimento dos espécimes

Para planificar a superfície da dentina os espécimes foram montados com cera cristal em um dispositivo para garantir o paralelismo entre a base e a superfície do espécime (Figura 6A e B). Posteriormente, os espécimes foram lixados em máquina de polimento Ecomet 3, utilizando-se lixas d'água de granulação 400, 600 e 1200 a uma velocidade de 80 rpm sob constante refrigeração de água (Figura 6C). Foram removidos 300 microns de dentina de cada espécime. Para o polimento foram utilizados discos de feltro e diamante em suspensão nas granulações: 6  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  e 0,25  $\mu\text{m}$  em baixa velocidade. Entre cada granulação e após o polimento final, os espécimes foram submetidos ao ultrassom com água deionizada por 5 min. e armazenados

individualmente em frascos de vidro com tampa. As figuras 7A, B e C ilustram as etapas do polimento: A- inicial; B- após a lixa 1200; C- final.

Todos os espécimes tiveram as margens isoladas com esmalte sintético, para evitar que as soluções penetrassem por outras superfícies, a não ser a superfície externa da dentina. Cada espécime teve uma metade coberta com fita de polivinila para servir de referência na comparação entre a área exposta e a área não exposta ao ciclo des-mineralização (des-re) (Figura 7 D). Os espécimes foram aleatoriamente divididos em 6 grupos com  $n=8$ .

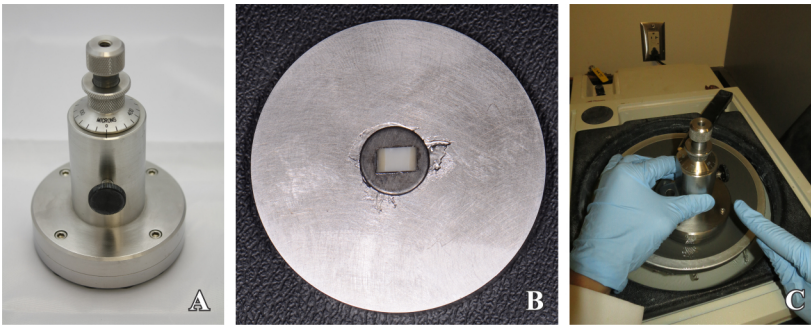


Figura 6 – Dispositivo auxiliar no polimento dos espécimes

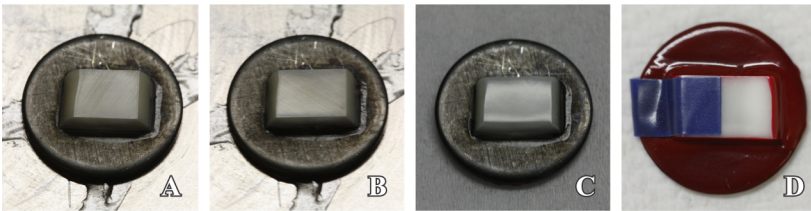


Figura 7 – Espécimes em cada etapa do polimento e isolamento com esmalte e fita adesiva

### 3.2.4 Ciclo experimental

Os grupos foram formados de acordo com a solução que foi utilizada para o tratamento da erosão:

Grupo 1 – Sem tratamento



- Grupo 2 – Solução tampão salina fosfato (PBS)
- Grupo 3 - Solução de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub>
- Grupo 4 – Solução de quitosana
- Grupo 5 – Solução de quitosana fosforilada (pH neutro)
- Grupo 6 – Solução de quitosana fosforilada (pH alcalino)

Após alguns estudos pilotos experimentais (APÊNDICE B) optou-se por utilizar um modelo de ciclo des-re seguido de tratamento semelhante ao descrito por Ganss *et al.* (2010a). Todos os espécimes foram submetidos a 30 ciclos erosivos em incubadora a 37°C com movimentos circulares de 100 rpm, sendo 6 ciclos por dia durante 5 dias.

Cada ciclo consistiu em imersão em 3,0 mL de ácido cítrico por 2 min., lavagem em água corrente deionizada por 30s, imersão em 3,0 mL de solução remineralizadora por 30 min., 3,0 mL de solução para tratamento por 2 min., 3,0 mL de solução remineralizadora por 30 min (Figura 8). Os espécimes do grupo 1 (sem tratamento) permaneceram na solução remineralizadora durante os 2 min. de tratamento. O ácido cítrico e a solução remineralizadora foram trocados a cada nova imersão do espécime na solução. As soluções de tratamento foram trocadas uma vez por dia.

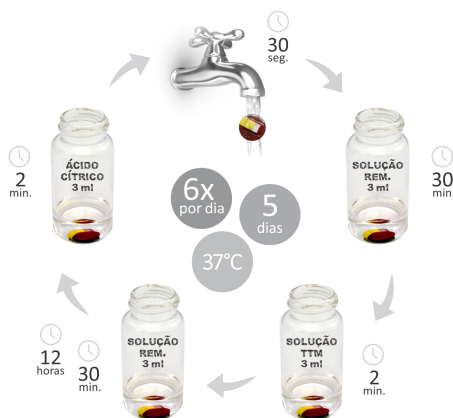


Figura 8 – Desenho esquemático do ciclo experimental

Ao final dos cinco dias de ciclo erosivo, a fita adesiva foi removida e a diferença entre a área exposta e a área não exposta ficou visível (Figura 9A).

### 3.2.5 Perfilometria

O degrau entre a área não exposta e a área exposta ao ciclo erosivo, determinando a quantidade de perda de estrutura de dentina, foi mensurado por um perfilômetro digital de contato (Figura 9B). Os parâmetros utilizados foram os seguintes: 2 g de força, 1000  $\mu\text{m}$  (500  $\mu\text{m}$  na área não exposta e 500  $\mu\text{m}$  na área exposta) de distância percorrida pela agulha, 50  $\mu\text{m/s}$  de velocidade e 100 Hz de frequência. O degrau foi lido em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) a partir da diferença de altura entre uma região de 100  $\mu\text{m}$  da área não exposta e 100  $\mu\text{m}$  da área exposta (Figura 9C). Foram lidos 3 degraus em 3 regiões diferentes da amostra com uma distância de 100  $\mu\text{m}$  entre elas.

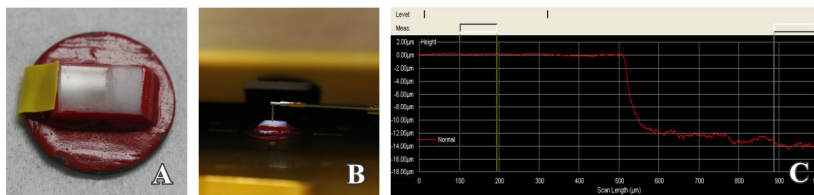


Figura 9 – Evidenciação da área não exposta e exposta e perfilometria

### 3.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após o tratamento, duas amostras representativas de cada grupo, selecionadas no momento da perfilometria, foram lavadas duas vezes em água deionizada, colocadas em cestos de tecido (Figura 10A) e desidratadas em etanol (10%, 30%, 50%, 75%, 90%, 100%, 100%, 100% - 15 minutos em cada solução etanólica) usando um processador. As amostras foram secas em um secador de ponto crítico usando dióxido de carbono como solvente de transição. Os blocos de dentina desidratados e secos foram montados em discos de alumínio usando pasta de prata coloidal (Figura 10B) e revestidos com 20 nm de liga de ouro-paládio (Figura 10C).

As amostras foram analisadas usando um microscópio eletrônico de varredura Zeiss Supra 25 operando a 5 kV, distância de 10-12 mm de trabalho, com uma abertura 30  $\mu\text{m}$ . As imagens digitais foram capturadas das regiões representativas a 0° e 40° de inclinação.

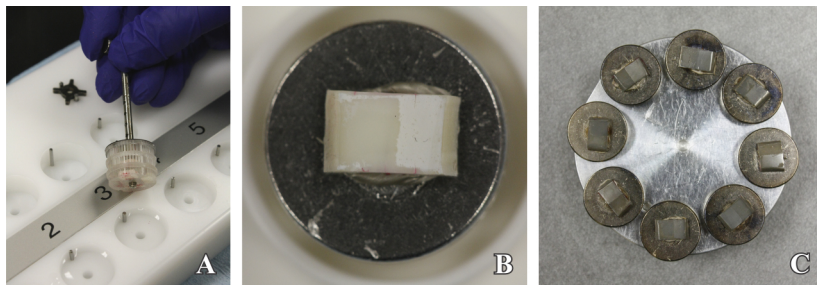


Figura 10 – Preparo das amostras para o MEV

### 3.2.7 Análise estatística

Os dados de perfilometria foram computados no Microsoft Excell (Microsoft Corporation, Redmont, WA, EUA) e a média entre os 3 degraus medidos de cada amostra foi calculada. A fim de verificar se existia diferença estatisticamente significativa na perda de estrutura de dentina média entre os grupos, foram aplicados os testes ANOVA One Way e Tukey com o auxílio do Software SPSS 21 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA) com nível de significância de 95% ( $p \leq 0,05$ ). Estes testes foram aplicados após a conferência de homogeneidade dos dados (Teste de Levene), e normalidade do erro padronizado (Shapiro-Wilk).



## 4 ARTIGO

REVISTA: CARIES RESEARCH

Título: Efeito da Quitosana Fosforilada na Erosão Dentinária – Estudo *in vitro*

Autores:

Beltrame, APCA – Universidade Federal de Santa Catarina

Suchyta, D – University of North Carolina

Alraheam, I - University of North Carolina

Schoenfisch, M – University of North Carolina

Walter, R – University of North Carolina

Souza, LC – Universidade Federal de Santa Catarina

Almeida, ICS – Universidade Federal de Santa Catarina

Título curto: Quitosana Fosforilada na Erosão Dentinária

Palavras-chaves: Erosão Dental, Dentina, Quitosana

Autor de correspondência:

Ana Paula C. A. Beltrame

Rua Professor Walter de Bona Castelan, 502

Córrego Grande, Florinaópolis, Santa Catarina, Brasil

CEP: 88037-300

Telefones: +55 48 3721-9920/ +55 48 3233-1498/ +55 48 9987-3652

E-mail: [anapaulabel@gmail.com](mailto:anapaulabel@gmail.com)

Declaração de interesse

Nenhum conflito de interesse é reportado.

## Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito anti-erosivo de soluções experimentais de quitosana fosforilada, em pH neutro e alcalino, em dentina. Espécimes de dentina bovina foram aleatoriamente distribuídas nos seguintes grupos (n=8): 1- Sem tratamento (controle negativo); 2- Solução tampão PBS (pH=7,4) (controle negativo); 3- Solução de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> (fluoreto de amina/fluoreto de sódio/cloreto de estanho - controle positivo), (pH=4,5); 4- Solução de quitosana 0,5% (pH=7,6); 5- Solução de quitosana fosforilada 0,5% (pH=7,0); 6- Solução de quitosana fosforilada 0,5% (pH=11,0). Os espécimes foram submetidos a ciclo des-remineralização seguido de tratamento durante 5 dias: ácido cítrico 0,5% (pH=2,3) (2 min., 6x/dia); solução remineralizadora (pH=6,5) (30 min., entre desafio ácido e tratamento e vice-versa/12 h durante a noite); tratamento (2 min., 6x/dia). A perda de estrutura de dentina foi mensurada por perfilometria e a superfície da dentina exposta ao ciclo des-re foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura. Houve diferença estatística entre os grupos quanto à perda de estrutura dentinária (p<0,001). A maior perda de dentina foi observada no grupo sem tratamento e o grupo tratado com PBS, que foram semelhantes entre si (p=0,79). O grupo tratado com Amf/NaF/SnCl<sub>2</sub> (controle positivo) apresentou menor perda de dentina (67%) (p<0,001), seguido pelos grupos tratados com quitosana fosforilada neutra e alcalina (33%) e quitosana (18%), os quais não diferiram entre si (p=0,06). A microscopia revelou preservação da integridade das fibras colágenas nos grupos tratados com AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> (controle positivo) e quitosana fosforilada alcalina. A solução experimental de quitosana fosforilada apresentou efeito favorável na manutenção da integridade das fibras colágenas, apesar de apresentar menor redução na perda dentinária quando comparada ao flúor. Novos estudos são sugeridos no sentido de aprimorar esse polímero para torná-lo eficaz na prevenção e tratamento da erosão dental.

**Palavras-chaves:** Erosão dental, dentina, quitosana

## Introdução

A prevalência expressiva da erosão dental, especialmente entre crianças e adolescentes [Jaeggi & Lussi, 2014], faz com que pesquisas na busca de novas formulações, para atuar na prevenção e no controle da dissolução da estrutura mineral do dente, sejam desenvolvidas. Diferente da doença cárie, o processo de desmineralização na erosão dental, segundo Featherstone e Lussi (2006), ocorre de forma progressiva e irreversível desde os seus estágios iniciais. Quando esse desgaste chega em dentina, as estratégias para o tratamento são mais desafiadoras visto que a dentina apresenta menor conteúdo mineral, menor dureza, e hidroxiapatita com mais carbonato, o que a torna mais susceptível a desmineralização quando comparada ao esmalte.

No controle da erosão tanto no esmalte, quanto na dentina, estudos apontam eficácia de até 90% de formulações que contém associação do flúor com substâncias iônicas (amina - AmF, estanho -  $\text{SnF}_2/\text{SnCl}_2$  e titânio -  $\text{TiF}_4$ ) em alta concentração [Hove et al. 2008; Schlueter et al. 2009; Passos et al. 2014]. Na dentina contudo, a solução de AmF/NaF/ $\text{SnCl}_2$  mostrou eficácia de até 50%, sendo menos expressiva *in situ* do que *in vitro* tanto em alta concentração [Schlueter et al., 2009a] quanto em baixa concentração [Ganss et al. 2010]. Essa diferença de resultado pode ser explicada pela ação das MMPs - metaloproteinases de matriz - contidas na saliva e na própria dentina que atuam na degradação das fibras colágenas e com isso aceleraram o processo erosivo. A preservação das fibras colágenas conferem à dentina uma maior resistência às forças mecânicas e dificultam a saída de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  através da superfície desmineralizada [Buzalaf et al. 2012].

Formulações para o controle da erosão dental com alto teor de flúor e íons metálicos podem ser tóxicos quando ingeridos com frequência [Lim et al. 1975; Wong et al. 2009; Choi et al. 2012] e as consequências da exposição excessiva ao flúor podem provocar além da fluorose dentária [Wong et al. 2009] problemas nos ossos, fígado, rins, trato gastrointestinal e cérebro [Choi et al. 2012; Perumal et al. 2013; Dharmaratne 2015].

Formulações livres de flúor, como cremes dentais que contém fosfosilicato de cálcio (NovaMin® NovaMin Technology Inc. Alachua, FL, USA) ou CPP-ACP (fosfopeptídeo de caseína e fosfato de cálcio amorfo) têm sido apresentadas como uma alternativa na prevenção e tratamento da erosão dental, mas têm mostrado resultados contraditórios [Ranjitkar et al. 2009; White et al. 2011; Wiegand & Attin 2014].

Muito pouco se conhece sobre os efeitos da quitosana na erosão dental. A quitosana é um polímero orgânico 100% natural, de baixo custo, atóxico, biocompatível, proveniente da quitina de carapaças de crustáceos [Ravi Kumar 2000]. Possui propriedades anti-oxidantes, anti-inflamatórias, anti-microbianas, cicatrizantes e de inibição de formação de biofilmes que torna o seu uso interessante na Odontologia [Sano et al. 2003; Bae et al. 2006]. Estudo comprova que a quitosana é capaz de se aderir à discos de hidroxiapatita e prevenir o desgaste erosivo [Lee et al. 2012] e a perda de íons fosfato sem, contudo, contribuir para a remineralização de lesões já existentes [Arnaud et al. 2010]. Por outro lado, micropartículas de quitosana com fluoreto de sódio apresentaram propriedade bioadesiva em mucosa esofágica de suíno e liberação lenta de flúor por um período de até 6 horas [Keegan et al. 2012]. Esse resultado pode sugerir uma atuação desse polímero na remineralização após desgaste erosivo, uma vez que manteria o flúor disponível por período prolongado. Quando adicionada aos cremes dentais, a quitosana, demonstrou efeito anti-erosivo em esmalte [Ganss et al. 2012], porém apresentou maior eficácia quando associada ao flúor e a íons metálicos [Ganss et al. 2011]. Em dentina, mesmo associada ao flúor, os resultados desse creme dental são menos expressivos [Ganss et al. 2014].

A fosforilação da molécula de quitosana pela adição de íons fósforo com o objetivo de torná-la solúvel em água, foi descrita inicialmente por Nishi et al. (1984). Além da solubilidade em pH neutro, a quitosana fosforilada apresenta como vantagem à quitosana pura uma maior capacidade de quelar íons cálcio devido aos grupos fosfato [Yokogawa et al. 1997], e apresentar propriedades de biocompatibilidade e osteoindução [Wang et al. 2002]. Estudos realizados com a quitosana fosforilada, para avaliação de sua capacidade em atuar na bioremineralização - imitação do processo natural de mineralização - do esmalte [Zhang et al. 2014] e da dentina [Xu et al. 2011], mostraram a habilidade da quitosana fosforilada em formar nanopartículas com fosfato de cálcio amorfo e assim proporcionar um padrão de remineralização semelhante ao esmalte hígido e diferente do padrão produzido pelo flúor. Em dentina, a quitosana fosforilada foi capaz de modificar a dentina desmineralizada favorecendo a deposição de íons cálcio e fosfato [Xu et al. 2011].

Apesar da existência de produtos indicados para prevenção e tratamento da erosão dental, as pesquisas mostram resultados controversos no controle da perda da estrutura dental e na recuperação da estrutura perdida, especialmente da dentina. Portanto se faz



importante estudar alternativas para o tratamento da erosão dental que possam atuar tanto na preservação da matriz orgânica dentinária como na reposição de minerais. Por essa razão, o objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito anti-erosivo de soluções experimentais de quitosana fosforilada, em pH neutro e alcalino, em dentina.

### **Materiais e Métodos**

A metodologia a seguir descreve o desenvolvimento de soluções de quitosana fosforilada, em pH neutro e alcalino, produzidas para serem utilizadas como tratamento em um ciclo des-remineralização em dentina bovina, com subsequente avaliação da perda de estrutura dentinária por meio de perfilometria e microscopia eletrônica de varredura.

Os reagentes utilizados na modificação da quitosana e no preparo das soluções foram os seguintes: quitosana de baixo peso molecular, ácido metassulfônico (MSA),  $(\text{CH}_3\text{SO}_3)$ , oxicleto de fósforo ( $\text{POCl}_3$ ) obtidos da Sigma-Aldrich Co (St. Louis, EUA), éter etílico ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ), tetraidrofurano (THF,  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ), etanol puro, ácido cítrico, ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) obtidos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA), cloreto de potássio (KCl - Mallinckrodt AR<sup>®</sup>, St. Louis, EUA) e bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$  - EMD Millipore Corporation, Billerica, EUA)

#### **Síntese da Quitosana Fosforilada**

A quitosana de baixo peso molecular foi solubilizada em MSA (30 mg/1mL), foi adicionado oxicleto de fósforo (1,030 mL de  $\text{POCl}_3$ /100 mg de quitosana) e esta mistura foi mantida sob agitação, por 72h, em temperatura ambiente, logo após foi adicionada água reagente tipo I (700 $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ /1,03mL de  $\text{POCl}_3$ ) à solução. Posteriormente, cerca de 5 mL da solução foram distribuídos em tubos de polipropileno (50 mL) e a lavagem da solução ocorreu em três etapas: 1- adição de 50% de éter etílico e THF na proporção de 1:1 (v/v; q.s.p. 50 mL); 2- adição de 30mL de THF; 3- adição de 70% de THF e 30% de etanol puro. Nas 3 etapas a adição dos solventes foi seguida de agitação manual, sonicação (5 min, nas etapas 2 e 3) e centrifugação (5.500 rpm, 3.517 g, 2 min., 25°C). Logo após a lavagem os tubos de polipropileno foram colocados num dessecador de baixa pressão por 24 horas e o pó de quitosana fosforilada foi coletado e pesado. Para a síntese de 2,25 g de quitosana com 30% de fosforilação foi necessário cerca de 3 vezes esta massa em quitosana de baixo peso molecular (aproximadamente 6,75 g).

### Preparo das soluções

Ácido cítrico 0,5%, com pH 2,3, foi utilizado para provocar a desmineralização das amostras. Uma solução remineralizadora foi preparada diariamente, para isso foram preparadas soluções com 0,4 mL de  $H_3PO_4$  em 40 mL de água destilada; 1,5 g de KCl em 100 mL de água destilada; 1,0 g de  $NaHCO_3$  em 100 mL de água destilada e 0,2 g de  $CaCl_2$  em 100 mL de água destilada, que foram adicionadas a 600 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 1 M e o volume final foi completado a 1000 mL com água destilada [Gerrard & Winter 1986].

Uma solução tampão salina fosfato (PBS) 10 mM, pH 7,4, foi preparada para ser utilizada na dissolução da quitosana e da quitosana fosforilada com a finalidade de manter o pH das soluções estável durante os dias do experimento. Soluções de quitosana e quitosana fosforilada, em pH neutro e alcalino, foram preparadas na concentração de 0,5% [Xu et al. 2011] (Tabela 1). A solução de quitosana pura apresentou-se parcialmente solubilizada, visto que ela é solúvel somente em meio ácido [Nishi et al. 1984].

As soluções foram preparadas um dia antes do início do experimento e separadas em cinco frascos, contendo a quantidade suficiente para um dia de experimento e posteriormente estocadas a -20°C. No início de cada dia de experimento foram retirados do freezer somente os frascos que seriam utilizados no dia e o pH das soluções foi aferido novamente.

### Preparo dos espécimes de dentina

Incisivos bovinos hígidos foram coletados e armazenados em solução de timol a 0,1% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). As coroas foram removidas (KG Sorensen<sup>®</sup>, Cotia, Brasil) e as raízes foram seccionadas (Buehler<sup>®</sup>, Lake Bluff, EUA), obtendo-se dois blocos por dente, do terço coronal da raiz, com dimensões de 8 mm x 4 mm x 2 mm. Os blocos foram colados com Super Bonder (Loctite<sup>®</sup> Brand, Westlake, EUA) em discos de aço inoxidável de 15mm de diâmetro (PELCO<sup>®</sup>, Ted Pella. Inc., Redding, EUA) e polidos (Buehler, Lake Bluff, EUA) utilizando-se lixas d'água de granulação 400, 600 e 1200 (3M<sup>®</sup>, St. Paul, EUA) e diamante em suspensão nas granulações: 6µm, 3 µm, 1 µm e 0,25 µm (Leco<sup>®</sup> Corporation, St. Joseph, EUA). Todos os espécimes tiveram as margens isoladas com esmalte sintético e a metade coberta com fita de povinil para servir de referência na comparação entre a área exposta e a área não exposta ao ciclo des-re. Os espécimes

foram aleatoriamente divididos em 6 grupos (n=8): 1- Sem tratamento (controle negativo); 2- PBS; 3- Solução de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> (controle positivo); 4- Quitosana (Qui); 5- Quitosana fosforilada neutra (Qui-F\_N); 6- Quitosana fosforilada alcalina (Qui-F\_A).

### Procedimento Experimental

Após alguns estudos experimentais prévios, para o estabelecimento do ciclo des-re e tratamento com diferença significativa entre os grupos controles negativo e positivo, optou-se por se fazer uma adaptação do ciclo des-re utilizado por [Ganss et al. 2010]. Cada espécime foi imerso em 3,0 mL de ácido cítrico por 2 min, lavado em água corrente deionizada por 30s, imerso em 3,0 mL de solução remineralizadora por 30 min., imerso em 3,0 mL da solução de tratamento por 2 min., e imerso novamente 3,0 mL de solução remineralizadora por 30 min. Os espécimes do grupo 1 (sem tratamento) permaneceram na solução remineralizadora durante os 2 min. de tratamento. Esses ciclos foram realizados em incubadora a 37°C com movimentos circulares de 100 rpm (C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA) e repetidos 6x por dia durante 5 dias consecutivos. O ácido cítrico e a solução remineralizadora foram trocados a cada nova imersão do espécime na solução. As soluções de tratamento foram trocadas uma vez por dia. Ao final a fita adesiva foi removida e a diferença entre a área exposta e a área não exposta foi avaliada por perfilometria e microscopia eletrônica de varredura.

### Perfilometria

A diferença entre a área não exposta e a área exposta ao ciclo erosivo foi mensurada por um perfilômetro digital de contato (P6 KLA Tencor, San Jose, EUA). Em cada espécime foram realizados 3 traços de 1000 µm (500 µm na área não exposta e 500 µm na área exposta) com distância entre eles de 100 µm (2 g de força, 50 µm/s, 100 Hz) [Ganss et al. 2014]. A diferença de altura entre 100 µm da área não exposta e 100 µm da área exposta de cada um dos traços foi lida por meio do software Apex (KLA Tencor, San Jose, EUA). A quantidade de perda de estrutura de dentina (expressa em µm) foi calculada a partir da média da diferença de altura (entre as áreas não exposta e exposta) dos 3 traços.

### Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram selecionados dois espécimes representativos de cada grupo no momento da perfilometria. Os espécimes foram lavados duas

vezes em água destilada, desidratados em etanol (10%, 30%, 50%, 75%, 90%, 100%, 100%, 100% - 15 minutos cada) e secos em um secador de ponto crítico (Tousimis Research Corporation, Rockville, MD). Os blocos de dentina desidratados e secos foram montados em discos de alumínio revestidos com 20 nm de liga de ouro-paládio (60Au: 40Pd, Hummer X Sputter Coater, Anatech USA, Union City, EUA) e analisados em MEV (5 kV, distância 10-12 mm, abertura 30  $\mu$ m) (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Peabody, EUA). As imagens digitais foram capturadas das regiões representativas a 0° e 40° de inclinação através do software Zeiss SmartSEM (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Peabody, EUA).

### Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do Software SPSS 21 (IBM Corporation, Armonk, EUA). Os testes de Levene e Shapiro-Wilk foram realizados para conferir a homogeneidade dos dados e a normalidade do erro padronizado, respectivamente. A diferença da eficácia entre as soluções foi analisada pelo teste ANOVA One Way. O teste post-hoc de Tukey foi aplicado após a verificação da diferença entre os grupos. O nível de significância utilizado para todos os testes foi 0,05.

## Resultados

### Perfilometria

Foi observada diferença estatisticamente significativa na perda de estrutura de dentina entre os diferentes tratamentos ( $p < 0,001$ ). Os grupos tratados com as soluções de quitosana fosforilada, com pH neutro e alcalino, não diferiram entre si ( $p = 0,063$ ), contudo, apresentaram menor perda de estrutura dentinária do que o grupo sem tratamento (controle negativo), PBS e quitosana, sendo o grupo tratado com PBS semelhante ao grupo tratado com a quitosana ( $p = 0,191$ ) e com o grupo sem tratamento ( $p = 0,792$ ). A menor perda dentinária entre todos os grupos, foi observada no grupo tratado com  $\text{AmF/NaF/SnCl}_2$  (controle positivo) ( $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

Em comparação com o grupo sem tratamento, o grupo controle positivo -  $\text{AmF/NaF/SnCl}_2$  - apresentou 67,37% de redução na perda de estrutura de dentina, seguido pela quitosana fosforilada alcalina e neutra, 32,62 e 32,85%, respectivamente, quitosana (18,33%), e PBS (6,46%) (Gráfico 1).

## Microscopia Eletrônica de Varredura

A figura 1 mostra imagens de cada grupo em diferentes aumentos. Nas imagens que mostram a interface entre as áreas expostas e não expostas ao ciclo des-re (Figura 1A), com aumento de 1000x, percebe-se a diferença entre as soluções utilizadas. O grupo controle positivo (AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub>) revelou um degrau menos expressivo entre as duas áreas. Num aumento de 5000x somente da área exposta (Figura 1B), também observa-se a diferença entre os tratamentos, sendo o grupo controle positivo e o grupo da quitosana fosforilada alcalina os que revelaram uma maior manutenção da matriz orgânica dentinária. Além disso, a matriz orgânica do grupo controle positivo parece estar ainda parcialmente mineralizada, diferente do grupo da quitosana fosforilada alcalina. Nos outros grupos observa-se lama dentinária cobrindo os túbulos. Na terceira coluna (Figura 1C) percebe-se, em aumento de 20000x, os túbulos dentinários mais arredondados nos grupos controle positivo e quitosana fosforilada alcalina com preservação da integridade das fibras colágenas.

## Discussão

A solução para o problema da erosão dental ainda não está estabelecida tendo em vista que os produtos existentes, com e sem fluoretos, não conseguem reduzir completamente a perda da estrutura dental. Além disso, o desenvolvimento do processo erosivo na dentina, bem como o modo de ação das formulações no controle do processo des-re nessa estrutura, têm sido estudados [Ganss et al. 2014], mas é necessário maior compreensão, visto que a dentina apresenta diferenças, principalmente estruturais, em relação ao esmalte. A quitosana mostrou um potencial anti erosivo em esmalte e dentina quando associada a íons metálicos e fluoretos [Ganss et al. 2012; Ganss et al. 2014]. Quanto à quitosana fosforilada, Zhang et al. (2014) e Xu et al. (2011) demonstraram a sua habilidade em favorecer a bioremineralização em esmalte e dentina, respectivamente. Entretanto esses estudos não avaliaram propriedades físicas do efeito da quitosana fosforilada no tecido dental, mostraram somente análise qualitativa de microscopia, além de terem utilizado um modelo de des-remineralização para a doença cárie.

No presente estudo os tratamentos com soluções de quitosana fosforilada 0,5%, num modelo de desafio erosivo, reduziram a perda dentinária em aproximadamente 32%, tanto no pH neutro quanto no pH alcalino, quando comparados ao grupo sem tratamento. Xu et al. (2011), em uma análise qualitativa, demonstraram a capacidade desse polímero

em favorecer a bioremineralização da dentina desmineralizada com a deposição de íons cálcio e fosfato .

A solução de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub>, utilizada como controle positivo, apresentou a maior redução da perda dentinária (67%). Resultado que está em acordo com outros autores que observaram redução de até 87% na perda de cálcio com essa mesma solução [Yu et al. 2010] e de 74% e 62% de redução da perda de dentina com uma solução de AmF/SnCl<sub>2</sub> e AmF/NaF, respectivamente [Ganss, et al. 2010].

O grupo tratado com solução de quitosana pura, mostrou redução na perda dentinária de 18%, sendo inferior aos 60% de eficácia de um creme dental com a mesma substância ativa [Aykut-Yetkiner et al. 2014]. Essa diferença pode ser explicada pela diferença de tempo nos quais os espécimes ficaram expostos ao ácido cítrico, sendo 2 min. 6x/dia durante 5 dias no presente estudo e 30s 6x/dia durante 6 dias no segundo estudo. Além disso, esse estudo utilizou a quitosana na forma de solução e não de creme dental. Na solução acontece a sedimentação das partículas de quitosana, que permaneceram insolúveis, característica essa que deve ter provocado um menor contato da superfície de dentina com essa substância. O estudo de Ganss et al. (2014) com um creme dental contendo quitosana e flúor mostrou uma redução de 25% na perda dentinária, sendo um resultado inferior quando comparado ao estudo de Aykut-Yetkiner et al. (2014). Importante salientar que não se pode precisar o quanto a quitosana contribui para esse resultado devido à presença de outros constituintes na composição desse creme dental.

A solução de PBS apresentou resultado semelhante ao grupo sem tratamento, mostrando não interferir no resultado dos grupos tratados com as soluções de quitosana e quitosana fosforilada, as quais apresentaram melhor resultado.

Pela microscopia eletrônica de varredura pode-se observar que a quitosana fosforilada no pH alcalino manteve a integridade das fibras colágenas. A preservação da integridade das fibras colágenas pode proporcionar à dentina uma maior resistência às forças mecânicas e dificultar a saída de íons cálcio e fosfato através da superfície desmineralizada [Buzalaf et al. 2012]. Xu et al. (2011), observaram por meio de microscopia eletrônica de varredura a formação de cristais de hidroxiapatita sobre a dentina desmineralizada e no interior dos túbulos, após ciclo des-re para a doença cárie e tratamento com solução de quitosana fosforilada. O ciclo des-re num modelo de desgaste erosivo pode ter interferido para a não observação da deposição de cristais de hidroxiapatita no presente estudo.

O fato da quitosana com pH alcalino ter mostrado preservar maior integridade das fibras colágenas, quando comparada ao pH neutro, pode ser explicado pelo mecanismo de ação das MMPs. As metaloproteinases de matriz, presentes na dentina, são ativadas em pH ácido (durante o desafio erosivo) e iniciam a degradação das fibras colágenas com a neutralização do pH pela ação tampão da saliva [Buzalaf et al. 2012]. O pH alcalino da solução de quitosana fosforilada, aplicada após cada ciclo de des-re, pode ter atuado como um inibidor da atuação das MMPs na degradação da matriz orgânica dentinária.

Os espécimes tratados com a solução de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> (controle positivo) e com a solução de quitosana fosforilada no pH alcalino mostraram túbulos dentinários mais arredondados e ausência de lama dentinária, na área exposta ao ciclo des-re, característicos de estágios iniciais de erosão dental em dentina [Levrini et al. 2014]. Por outro lado, a área exposta da dentina do grupo sem tratamento e dos grupos tratados com as demais soluções (PBS, quitosana e quitosana fosforilada no pH neutro), apresentou túbulos dentinários mais fechados e presença de lama dentinária, características condizentes com estágios mais avançados da erosão dentinária [Levrini et al. 2014].

Em conclusão, a solução de quitosana fosforilada no pH alcalino demonstrou habilidade em atuar reduzindo a degradação das fibras colágenas, sugerindo que esse polímero pode favorecer a resistência da superfície dentinária frente ao desafio erosivo. As soluções de quitosana fosforilada estudadas apresentaram limitação na redução da perda dentinária após desafio erosivo quando comparadas a solução contendo fluoretos e íons metálicos. Novos estudos precisam ser realizados com o objetivo de aprimorar as formulações com esse polímero para que no futuro ele possa se tornar uma alternativa eficaz e segura na prevenção e tratamento da erosão dentária.

### **Agradecimentos**

Esse estudo teve o suporte financeiro da UNC (University of North Carolina) – Chapel Hill e da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

### **Referências**

- Arnaud TMS, Barros Neto B, Diniz FB: Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: an in vitro evaluation. J Dent 2010; 38(11): 848–852.
- Aykut-Yetkiner A, Attin T, Wiegand A: Prevention of dentine erosion by brushing with anti-erosive toothpastes. J Dent 2014; 42(7):

856–861.

- Bae K, Jun EJ, Lee SM, Paik DI, Kim JB: Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. *Clin Oral Invest* 2006; 10(2):102–107.
- Buzalaf MAR, Kato MT, Hannas AR: The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res* 2012, 24(2): 72–76.
- Choi AL, Sun G, Zhang Y, Grandjean P: Developmental fluoride neurotoxicity: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect* 2012; 120(10): 1362–1368.
- Dharmaratne RW: Fluoride in drinking water and diet: the causative factor of chronic kidney diseases in the North Central Province of Sri Lanka. *Environ Health Prev Med* 2015; 20(4): 237–242.
- Featherstone JDB, Lussi A: Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci* 2006; 20: 66–76.
- Ganss C, Lussi A, Grunau O, Klimek J, Schlueter N: Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. *Caries Res* 2011; 45(6):581–589.
- Ganss C, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Schlueter N: Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized in situ trial on erosion. *J Dent Res* 2010; 89(11): 1214–1218.
- Ganss C, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N: Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. *Caries Res* 2010; 44(3): 248–252.
- Ganss C, von Hinckeldey J, Tolle A, Schulze K, Klimek J, Schlueter N: Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpastes on enamel erosion/abrasion. *J Dent* 2012; 40(12): 1036–1043.
- Ganss C, Klimek J, Schlueter N: Erosion/abrasion-preventing potential of NaF and F/Sn/Chitosan toothpastes in dentine and impact of the organic matrix. *Caries Res* 2014; 48:163–169.
- Gerrard W, Winter P: Evaluation of toothpastes by their ability to assist rehardening of enamel in vitro. *Caries Res* 1986; 20: 209–216.
- Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB: The protective effect of TiF<sub>4</sub>, SnF<sub>2</sub> and NaF against erosion-like lesions in situ. *Caries Res* 2008; 42(1): 68–72.
- Jaeggi T, Lussi A: Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci* 2014; 25: 55–73.
- Keegan GM, Smart JD, Ingram MJ, Barnes LM, Burnet GR, Rees GD: Chitosan microparticles for the controlled delivery of fluoride. *J Dent* 2012; 40(3): 229–240.
- Lee HS, Tsai S, Kuo CC, et al.: Chitosan adsorption on hydroxyapatite



- and its role in preventing acid erosion. *J Colloid Interface Sci* 2012; 385(1): 235–243.
- Levrini L, Di Benedetto G, Raspanti M: Dental wear: a scanning electron microscope study. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 340425.
- Lim JKJ, Jensen GK, King OH: Some toxicological aspects of stannous fluoride after ingestion as a clear, precipitatefree solution compared to sodium fluoride. *J Dent Res* 1975; 54(3): 615–625.
- Nishi N, Nishimura S, Ebina A, Tsutsumi A, Tokura S: Preparation and characterization of water-soluble chitin phosphate. *Int J Biol Macromol* 1984; 6(1): 53–54.
- Passos VF, Vasconcellos AA, Pequeno JHP, Rodrigues LKA, Santiago SL: Effect of commercial fluoride dentifrices against hydrochloric acid in an erosion-abrasion model. *Clin Oral Invest* 2014; 19(1):71–76.
- Perumal E, Paul V, Govindarajan V, Panneerselvam L: A brief review on experimental fluorosis. *Toxicol Lett* 2013; 223(2): 236–251.
- Ranjitkar S, Narayana T, Kaidonis JA, Hughes TE, Richards LC, Townsend GC: The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on erosive dentine wear. *Aust Dent J* 2009; 54(2): 101–107.
- Ravi Kumar MN: A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 2000; 46(1): 1–27.
- Sano H, Shibasaki K, Matsukubo T, Takaesu Y: Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. *Bulletin Tokyo Dent Coll* 2003; 44(1): 9–16.
- Schlueter N, Duran A, Klimek J, Ganss C: Investigation of the effect of various fluoride compounds and preparations thereof on erosive tissue loss in enamel in vitro. *Caries Res* 2009; 43: 10–16.
- Schlueter N, Klimek J, Ganss C: Efficacy of an experimental tin-f-containing solution in erosive tissue loss in enamel and dentine in situ. *Caries Res* 2009; 43(6): 415–421.
- Wang X, Ma J, Wang Y, He B: Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2002; 23(21): 4167–4176.
- White AJ, Gracia LH, Barbour ME: Inhibition of dental erosion by casein and casein-derived proteins. *Caries Res* 2011; 45(1): 13–20.
- Wiegand A, Attin T: Randomized in situ trial on the effect of milk and CPP-ACP on dental erosion. *J Dent* 2014; 42(9): 1210–1215.
- Wong MCM, Glenny AM, Tsang BWK, Lo ECM, Worthington HV, Marinho VCC: Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 20(1): CD007693.

- Xu Z, Neoh KG, Lin CC, Kishen A: Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011; 98(1): 150–159.
- Yokogawa Y, Paz Reyes J, Mucalo MR, et al.: Growth of calcium phosphate on phosphorylated chitin fibres. *J Mater Sci Mater Med* 1997; 8(7): 407–412.
- Yu H, Wegehaupt FJ, Zaruba M, et al.: Erosion-inhibiting potential of a stannous chloride-containing fluoride solution under acid flow conditions in vitro. *Arch Oral Biol* 2010; 55(9): 702–705.
- Zhang X, Li Y, Sun, X, et al.: Biomimetic remineralization of demineralized enamel with nano-complexes of phosphorylated chitosan and amorphous calcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med* 2014; 25(12): 2619–2628.

Gráfico 1 – Porcentagem de redução na perda de dentina nos grupos de tratamento em relação ao grupo controle negativo.

PBS= Tampão fosfato-salina; AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub>= Fluoreto de amina, fluoreto de sódio e cloreto de estanho; Qui= Quitosana; Qui-F\_N= Quitosana fosforilada neutra; Qui-F\_A= Quitosana fosforilada alcalina

Figura 1 – Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura da superfície dentinária das amostras tratadas com as diferentes soluções. A: Interface entre a área não exposta e a área exposta ao ciclo des-re (1000x, inclinação 40°); B: Área da dentina exposta (5.000x); C: Área da dentina exposta em maior magnificação (20.000x).

PBS= Solução salina fosfato; AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub>= Solução de fluoreto de amina, fluoreto de sódio e cloreto de estanho; Qui= Quitosana; Qui-F\_N= Quitosana fosforilada neutra; Qui-F\_A= Quitosana fosforilada alcalina

Tabela 1 – Composição das soluções controles e experimentais de acordo com o pH, o meio de dissolução e as substâncias ativas.

|                               | pH   | Meio   | Substâncias ativas  |
|-------------------------------|------|--|---|
| <b>Soluções controles</b>     |      |  |   |
| PBS 10mM                      | 7,4  | H <sub>2</sub> O, NaHPO <sub>4</sub> , NaCl, NaOH 1M   |   |
| AmF/NaF/SnCl <sub>2</sub>     | 4,5  | Água, glicerina, gluconato de sódio, PEG-40, aromatizante, cocamidopropil betaína, sacarina sódica, ácido hidrocloreídrico | AmF<br>125 ppm F <sup>-</sup><br>NaF<br>375 ppm F <sup>-</sup><br>SnCl <sub>2</sub><br>800 ppm Sn <sup>2+</sup> |
| Quitosana                     | 7,6  | PBS 10mM   | 0,5% quitosana insolúvel  |
| <b>Soluções experimentais</b> |      |  |   |
| Quitosana                     | 7,0  | PBS 10mM   | 0,5%  |
| Fosforilada                   |      | NaOH 1M  | quitosana   |
| Neutra                        |      |  | 30% de PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>  |
| Quitosana                     | 11,0 | PBS 10mM   | 0,5%  |
| Fosforilada                   |      | NaOH 1M  | quitosana   |
| Alcalina                      |      |  | 30% de PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>  |

PBS= solução salina fosfato; H<sub>2</sub>O= água; NaHPO<sub>4</sub>= fosfato de sódio; NaCl= cloreto de sódio; NaOH= hidróxido de sódio; AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub>= solução de fluoreto de amina/fluoreto de sódio/cloreto de estanho; AmF= fluoreto de amina; NaF= fluoreto de sódio; SnCl<sub>2</sub>= cloreto de estanho.

Tabela 2 – Média e desvio padrão da perda de estrutura dentinária após 5 dias de ciclo des-remineralização e tratamento com as soluções controles e experimentais.

| Grupo   | Perda dentinária ( $\mu\text{m}$ )<br>média $\pm$ DP |
|---|--|
| Sem tratamento (controle negativo)            | 26,45 $\pm$ 2,22 <sup>d</sup>                        |
| PBS   | 24,74 $\pm$ 2,15 <sup>cd</sup>                       |
| AmF/NaF/SnCl <sub>2</sub> (controle positivo) | 8,63 $\pm$ 1,94 <sup>a</sup>                         |
| Quitosana                                     | 21,60 $\pm$ 3,65 <sup>bc</sup>                       |
| Quitosana Fosforilada Neutra                  | 17,76 $\pm$ 3,30 <sup>b</sup>                        |
| Quitosana Fosforilada Alcalina                | 17,82 $\pm$ 2,18 <sup>b</sup>                        |

PBS= solução fosfato-salina; AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub>= solução de fluoreto de amina, fluoreto de sódio e cloreto de estanho.

Médias seguidas por letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ).

Gráfico 1

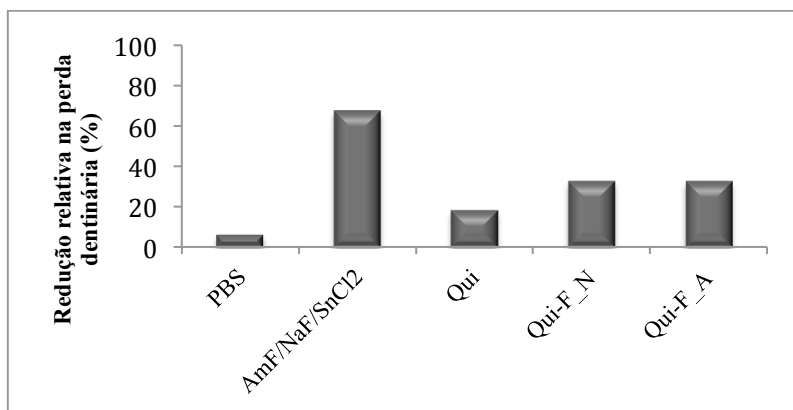
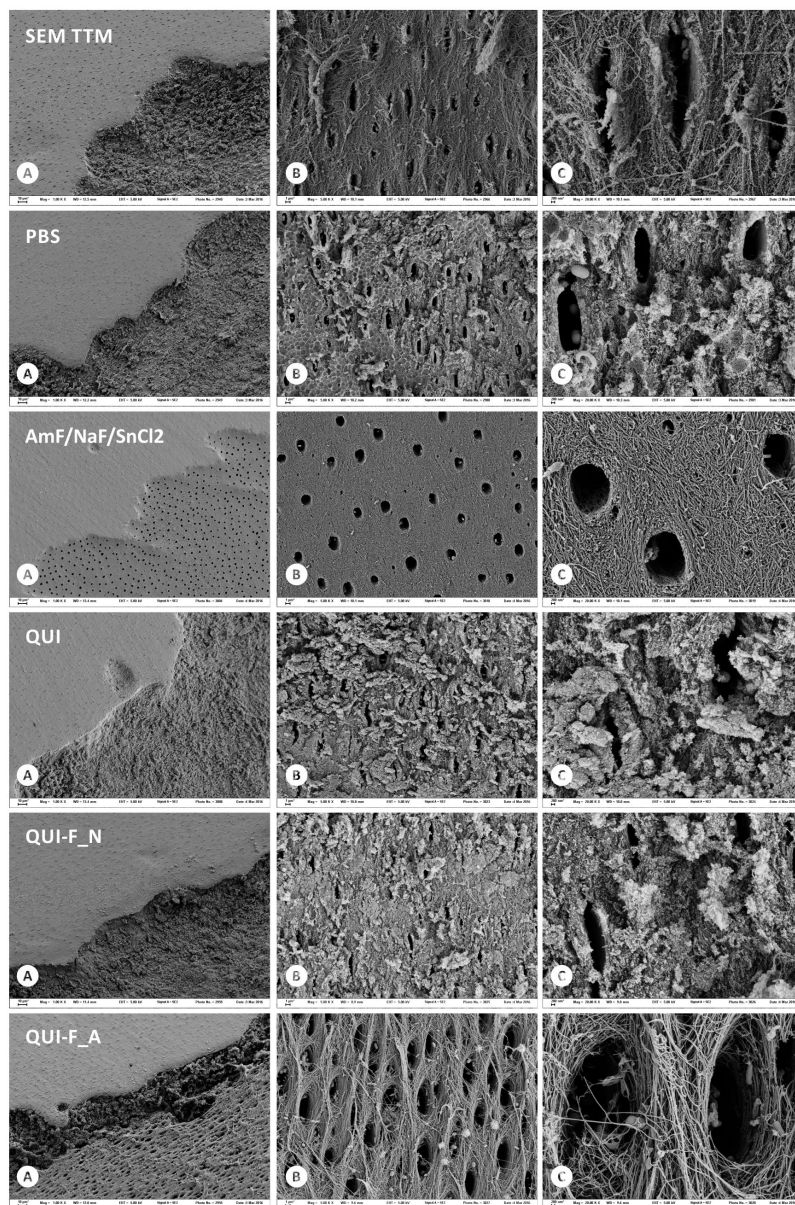


Figura 1





## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo foi desenvolvido na Escola de Odontologia da Universidade da Carolina do Norte, em Chapel Hill, em parceria com o Departamento de Química da mesma universidade. A metodologia utilizada para a fosforilação da quitosana foi desenvolvida especialmente para esse estudo. Vários estudos pilotos foram realizados até se chegar num grau de fosforilação adequado para a completa solubilização da quitosana fosforilada e com alguma eficácia sobre a dentina submetida a ciclo erosivo (Apêndice B).

A solução de quitosana fosforilada no pH alcalino demonstrou habilidade para atuar na preservação das fibras colágenas. Quanto a redução na perda dentinária as soluções de quitosana fosforilada, em pH neutro e alcalino, apresentaram uma limitação. Portanto, novos estudos precisam ser realizados a fim de aprimorar esse polímero, seja no aumento da sua concentração ou no aumento do seu grau de fosforilação.

Entretanto, os resultados promissores desse estudo aliados ao baixo custo, atoxicidade e biocompatibilidade da quitosana fazem com que esse polímero possa se tornar uma alternativa eficaz e segura na prevenção e tratamento da erosão em ambos os tecidos, esmalte e dentina.



## 6 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Y. et al., 2014. Association between dental erosion and diet in Brazilian adolescents aged from 15 to 19: a population-based study. **The Scientific World Journal**, v.2014, p.7, 2014.
- ARNAUD, T.M.S.; BARROS NETO, B.; DINIZ, F.B. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: an in vitro evaluation. **Journal of dentistry**, v.38, n.11, p.848–852, 2010.
- AUAD, S. et al. Dental erosion amongst 13- and 14-year-old Brazilian schoolchildren. **International Dental Journal**, v. 57, n. 3, p.161–167, 2007.
- AYKUT-YETKINER, A.; ATTIN, T.; WIEGAND, A. Prevention of dentine erosion by brushing with anti-erosive toothpastes. **Journal of Dentistry**, v. 42, n. 7, p.856–861, 2014.
- BAE, K. et al. Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. **Clinical Oral Investigation**, v. 10, n. 2, p.102–107, 2006.
- BUZALAF, M. A. R.; KATO, M. T.; Hannas, A. R. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. **Advances in Dental Research**, v. 24, n. 2, p.72–76, 2012.
- BUZALAF, M. A. R.; MAGALHAES, A. C.; WIEGAND, A. Alternatives to fluoride in the prevention and treatment of dental erosion. **Monographs in Oral Science**, v. 25, p.244–252, 2014.
- CHOI, A. L. et al. Developmental fluoride neurotoxicity: A systematic review and meta-analysis. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 10, p.1362–1368, 2012.
- COMAR, L. P. et al. Effect of NaF, SnF(2), and TiF(4) Toothpastes on bovine enamel and dentin erosion-abrasion *in vitro*. **International Journal of Dentistry**, v. 2012, p.6, 2012.
- DHARMARATNE, R.W. Fluoride in drinking water and diet: the causative factor of chronic kidney diseases in the North Central Province of Sri Lanka. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v.20, n.4, p.237–242.
- FEATHERSTONE, J. D. B.; LUSSI, A. Understanding the chemistry of dental erosion. **Monographs in Oral Science**, v. 20, p.66–76,

2006.

- GANSS, C. et al. Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized *in situ* trial on erosion. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 11, p.1214–1218, 2010.
- GANSS, C. et al. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. **Caries Research**, v. 44, n. 3, p.248–252, 2010a.
- GANSS, C. et al. Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. **Caries Research**, v. 45, n. 6, p.581–589, 2011.
- GANSS, C. et al. Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpastes on enamel erosion/abrasion. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 12, p.1036–1043, 2012.
- GANSS, C.; LUSSI, A.; SCHLUETER, N. The histological features and physical properties of eroded dental hard tissues. **Monographs in Oral Science**, v. 25, p.99–107, 2014.
- GANSS, C.; KLIMEK, J.; SCHLUETER, N. Erosion/abrasion-preventing potential of NaF and F/Sn/Chitosan toothpastes in dentine and impact of the organic matrix. **Caries Research**, v. 48, p.163–169, 2014a.
- GERRARD, W.; WINTER, P. Evaluation of toothpastes by their ability to assist rehardening of enamel in vitro. **Caries Research**, v. 20, p.209–216, 1986.
- GURGEL, C. V. et al. Dental erosion in a group of 12- and 16-year-old Brazilian schoolchildren. **Pediatric Dentistry**, v. 33, n. 1, p.23–28, 2011.
- HOVE, L. H. et al. The protective effect of  $\text{TiF}_4$ ,  $\text{SnF}_2$  and NaF against erosion-like lesions *in situ*. **Caries Research**, v. 42, n. 1, p.68–72, 2008.
- HOVE, L. H. et al. Protective effect of  $\text{TiF}_4$  solutions with different concentrations and pH on development of erosion-like lesions. **Caries Research**, v. 45, n. 1, p.64–68, 2011.
- HUYSMANS, M. C. D. N. J. M. et al. Reduction of erosive wear in situ by stannous fluoride-containing toothpaste. **Caries Research**, v.

- 45, n.6, p.518–523, 2011.
- IMFELD, T. Dental erosion. Definition, classification and links. **European Journal of Oral Sciences**, v. 104, n. 2 (Pt 2), p.151–155, 1996.
- JAEGGI T. & LUSSI A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. **Monographs in Oral Science**, v. 25, p.55–73, 2014.
- KANZOW, P. et al. Etiology and pathogenesis of dental erosion. **Quintessence international**, v. 47, n.4, p.275–278, 2016.
- KEEGAN, G. M. et al. Chitosan microparticles for the controlled delivery of fluoride. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 3, p.229–240, 2012.
- LEE, H. S. et al. Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 385, n. 1, p.235–243, 2012.
- LEVRINI, L.; DI BENEDETTO, G.; RASPANTI, M. Dental wear: a scanning electron microscope study. **BioMed Research International**, v.2014, p.340425, 2014.
- LIM, J. K. J.; JENSEN, G. K.; KING, O. H. Some toxicological aspects of stannous fluoride after ingestion as a clear precipitate free solution compared to sodium fluoride. **Journal of Dental Research**, v. 54, n. 3, p.615–625, 1975.
- LUSSI, A. et al. Dental erosion-an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. **Caries research**, v. 45, Suppl 1, p.2–12, 2011.
- LUSSI, A. et al. Analysis of the erosive effect of different dietary substances and medications. **British Journal of Nutrition**, v. 107, p.252–262, 2012.
- MAGALHÃES, A. C. et al. Effect of different concentrations of fluoride in dentifrices on dentin erosion subjected or not to abrasion *in situ/ex vivo*. **Caries Research**, v. 42, p.112–116, 2008.
- MAGALHÃES, A. C. et al. Insights into preventive measures for dental erosion. **Journal of Applied Oral Science**, v. 17, n. 2, p.75–86, 2009.
- MAGALHÃES, A. C. et al. Effect of NaF and TiF(4) varnish and

- solution on bovine dentin erosion plus abrasion *in vitro*. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 70, n. 2, p.160–164, 2012.
- MURAKAMI, C. et al. Risk indicators for erosive tooth wear in Brazilian preschool children. **Caries Research**, v. 45, n. 2, p.121–129, 2011.
- NISHI, N. et al. Preparation and characterization of water-soluble chitin phosphate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 6, n. 1, p.53–54, 1984.
- PASSOS, V. F. et al. Effect of commercial fluoride dentifrices against hydrochloric acid in an erosion-abrasion model. **Clinical Oral Investigations**, v. 19, n. 1, p.71–76, 2014.
- PERUMAL, E. et al. A brief review on experimental fluorosis. **Toxicology Letters**, v. 223, n. 2, p.236–251, 2013.
- RALLAN, M. et al. Effect of various remineralising agents on human eroded enamel of primary teeth. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 14, n. 5, p.313–318, 2013.
- RANJITKAR, S. et al. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on erosive dentine wear. **Australian Dental Journal**, v. 54, n. 2, p.101–107, 2009.
- RAVI KUMAR, M. N. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p.1–27, 2000.
- SANO, H. et al. Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 44, n. 1, p.9–16, 2003.
- SCHLUETER, N. et al. Effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on erosion progression in enamel and dentine *in vitro*. **Caries Research**, v. 41, n. 2, p.141–145, 2007.
- SCHLUETER, N. et al. Investigation of the effect of various fluoride compounds and preparations thereof on erosive tissue loss in enamel *in vitro*. **Caries Research**, v. 43, p.10–16, 2009.
- SCHLUETER, N.; KLIMEK, J.; GANSS, C. Effect of stannous and fluoride concentration in a mouth rinse on erosive tissue loss in enamel *in vitro*. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 5, p.432–436, 2009a.

- SCHLUETER, N.; KLIMEK, J.; GANSS, C. Efficacy of an experimental tin-F-containing solution in erosive tissue loss in enamel and dentine *in situ*. **Caries Research**, v. 43, n. 6, p.415–421, 2009b.
- SCHLUETER, N.; JAEGGI, T.; LUSSI, A. Is dental erosion really a problem? **Advances in Dental Research**, v. 24, n. 2, pp.68–71, 2012.
- SCHLUETER, N.; KLIMEK, J.; GANSS, C. Randomised *in situ* study on the efficacy of a tin/chitosan toothpaste on erosive-abrasive enamel loss. **Caries Research**, v. 47, n. 6, p.574–581, 2013.
- SCHLUETER, N.; KLIMEK, J.; GANSS, C. Effect of a chitosan additive to a Sn<sub>2</sub><sup>+</sup>-containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy a controlled randomised *in situ* trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, n. 1, p.107–115, 2014.
- SEN, B. H.; KAZEMI, R. B.; SPÅNGBERG, L. S. Morphologic effects on L929 fibroblasts of titanium tetrafluoride application. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 86, n. 3, p.341–346, 1998.
- SILVA, C. R. et al. Biological effects of stannous chloride, a substance that can produce stimulation or depression of the central nervous system. **Brain Research Bulletin**, v. 59, n. 3, p.213–216, 2002.
- SOMANI, R. et al. Remineralizing potential of various agents on dental erosion. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 4, n. 2, p.104–108, 2014.
- SRINIVASAN, N.; KAVITHA, M.; LOGANATHAN, S.C. Comparison of the remineralization potential of CPP-ACP and CPP-ACP with 900 ppm fluoride on eroded human enamel: An *in situ* study. **Archives of Oral Biology**, v.55, n.7, pp.541–544, 2010.
- TURSSI, C. P. et al. Effect of potential remineralizing agents on acid softened enamel. **American Journal of Dentistry**, v. 24, n. 3, p.165–168, 2011.
- VARGAS-FERREIRA, F.; PRAETZEL, J. R.; ARDENGHI, T.M. Prevalence of tooth erosion and associated factors in 11-14-year-old Brazilian schoolchildren. **Journal of Public Health Dentistry**, v. 71, n. 1, p.6–12, 2011.

- WANG, C. P. et al. The CPP-ACP relieved enamel erosion from a carbonated soft beverage: an in vitro AFM and XRD study. **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 3, p.277–282, 2014.
- WANG, X. et al. Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. **Biomaterials**, v. 23, n. 21, p.4167–4176, 2002.
- WANG, X. et al. Preventing erosion with novel agents. **Journal of Dentistry**, v. 39, n. 2, p.163–170, 2011.
- WEGEHAUPT, F. J. et al. Influence of extra- and intra-oral application of CPP-ACP and fluoride on re-hardening of eroded enamel. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 70, n. 3, p.177–183, 2012.
- WHITE, A. J.; GRACIA, L. H.; BARBOUR, M. E. Inhibition of dental erosion by casein and casein-derived proteins. **Caries Research**, v. 45, n. 1, p.13–20, 2011.
- WHITFORD, G. M. Acute toxicity of ingested fluoride. **Monographs in Oral Science**, v. 22, p.66–80, 2011.
- WIEGAND, A. & ATTIN, T. Randomized in situ trial on the effect of milk and CPP-ACP on dental erosion. **Journal of Dentistry**, v. 42, p.1210–1215, 2014.
- WONG, M. C. M. et al. Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 20, n. 1, CD007693, 2010.
- XU, Z. et al. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 98 B, p.150–159, 2011.
- YOKOGAWA, Y. et al. Growth of calcium phosphate on phosphorylated chitin fibres. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 8, n. 7, p.407–412, 1997.
- YU, H. et al. Effects of various fluoride solutions on enamel erosion in vitro. **Caries Research**, v. 44, n. 4, p.390–401, 2010.
- YU, H. et al. Erosion-inhibiting potential of a stannous chloride-containing fluoride solution under acid flow conditions in vitro.



**Archives of oral biology**, v.55, n.9, pp.702–705, 2010a.

ZHANG, X. et al. Biomimetic remineralization of demineralized enamel with nano-complexes of phosphorylated chitosan and amorphous calcium phosphate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 12, p.2619–2628, 2014.



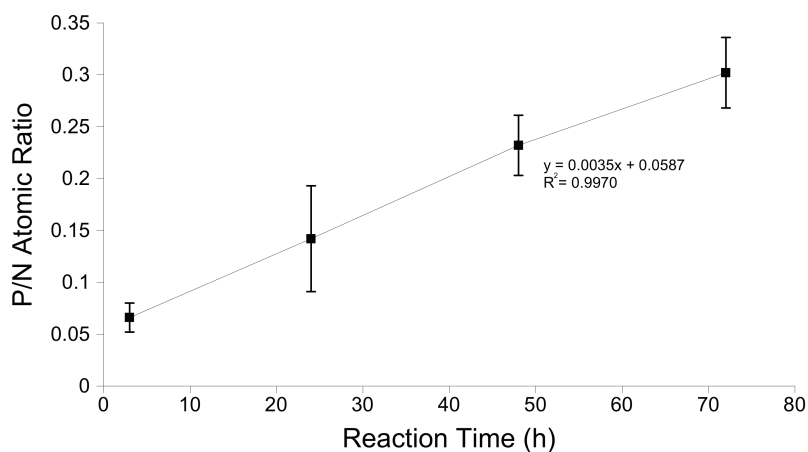
## APÊNCIDE A – CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA FOSFORILADA

### 1. Peso molecular

O peso molecular da partícula de quitosana fosforilada foi de 83.520 +/- 410 nm.

### 2. Grau de fosforilação da quitosana

Gráfico 1. Grau de fosforilação da quitosana após 72h de reação.





## APÊNCIDE B – RESULTADOS DOS ESTUDOS PILOTOS

### ESTUDO PILOTO 1

Grupos:

- 1- Sem tratamento (controle negativo);
- 2- Solução de SnF (fluoreto de estanho), pH=4,5;
- 3- Solução de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> (fluoreto de amina/fluoreto de sódio/cloreto de estanho), pH=4,5.

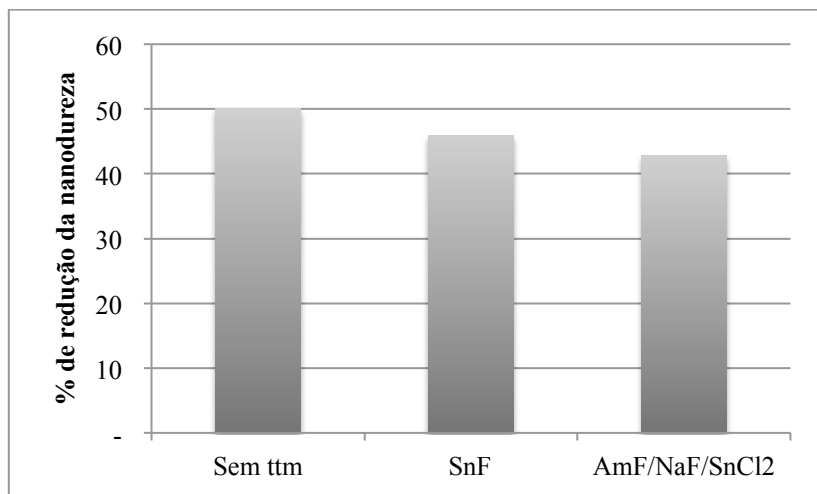
Ciclo:

Ácido cítrico 0,5% (pH=3,5) (2 min., 6x/dia);

Solução remineralizadora (pH=6,5) (30 min., entre desafio ácido e tratamento e vice-versa/12 h durante a noite);

Tratamento (2 min., 2x/dia – após o primeiro e o último desafio erosivo do dia).

Gráfico 2 – Porcentagem (%) de redução da nanodureza de dentina nos diferentes grupos.



ttm = tratamento; SnF = fluoreto de estanho; AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub>= fluoreto de amina, fluoreto de sódio e cloreto de estanho.

OBS.: Não houve grande diferença entre o grupo sem tratamento e os grupos que receberam tratamento com solução fluoretada. Optou-se por modificar o ciclo realizando o tratamento 6x/dia, após cada desafio erosivo.

## ESTUDO PILOTO 2

Grupos:

- 1- Sem tratamento (controle negativo);
- 2- Solução de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> (fluoreto de amina/fluoreto de sódio/cloreto de estanho), pH=4,5;
- 3- Solução de NaF 10000 ppm (fluoreto de sódio), pH=8,5.

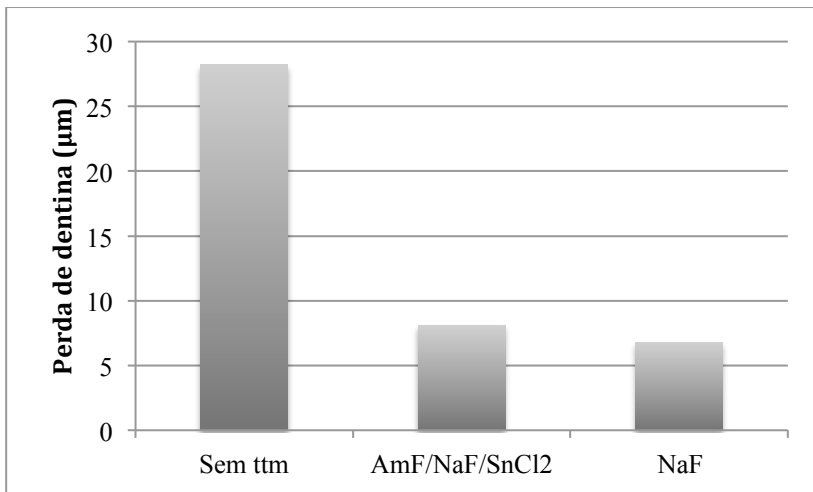
Ciclo:

Ácido cítrico 0,5% (pH=2,5) (2 min., 6x/dia);

Solução remineralizadora (pH=6,5) (30 min., entre desafio ácido e tratamento e vice-versa/12 h durante a noite);

Tratamento (2 min., 6x/dia).

Gráfico 3 – Perda de dentina em micrômetros (μm) nos diferentes grupos.



ttm = tratamento; AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> = fluoreto de amina, fluoreto de sódio e cloreto de estanho; NaF = fluoreto de sódio.

OBS.: Houve grande diferença entre o grupo sem tratamento e os grupos que receberam tratamento com solução fluoretada. Optou-se por manter o ciclo experimental e utilizar a Solução de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> como controle positivo.

### ESTUDO PILOTO 3

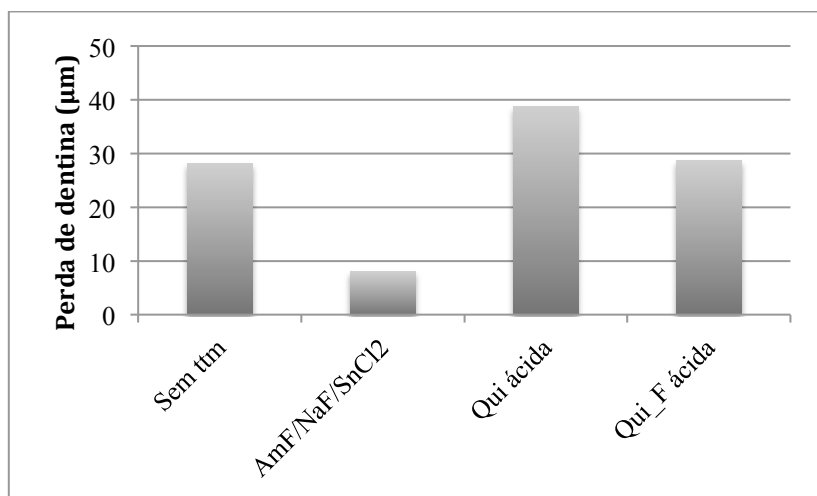
Grupos:

- 1- Sem tratamento (controle negativo);
- 2- Solução de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> (fluoreto de amina/fluoreto de sódio/cloreto de estanho), pH=4,5;
- 3- Solução de quitosana solúvel ácida, pH=3,2;
- 4- Solução de quitosana fosforilada solúvel ácida (15% fosforilação), pH=3,2.

Ciclo:

Ácido cítrico 0,5% (pH=2,5) (2 min., 6x/dia);  
 Solução remineralizadora (pH=6,5) (30 min., entre desafio ácido e tratamento e vice-versa/12 h durante a noite);  
 Tratamento (2 min., 6x/dia).

Gráfico 4 – Perda de dentina em micrômetros (μm) nos diferentes grupos.



ttm = tratamento; AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> = fluoreto de amina, fluoreto de sódio e cloreto de estanho; Qui = Quitosana; Qui\_F = Quitosana fosforilada.

OBS.: As soluções de quitosana e quitosana fosforilada em pH ácido promoveram maior perda de dentina do que o grupo sem tratamento. Optou-se por aumentar o grau de fosforilação para tentar solubilizar a quitosana fosforilada em pH neutro ou alcalino.

## ESTUDO PILOTO 4

Grupos:

- 1- Sem tratamento (controle negativo);
- 2- Solução de AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> (fluoreto de amina/fluoreto de sódio/cloreto de estanho), pH=4,5;
- 3- Solução tampão salina fosfato (PBS), pH=7,4;
- 4- Solução de quitosana insolúvel neutra, pH=7,6;
- 5- Solução de quitosana fosforilada solúvel alcalina (30% de fosforilação), pH=11,0.

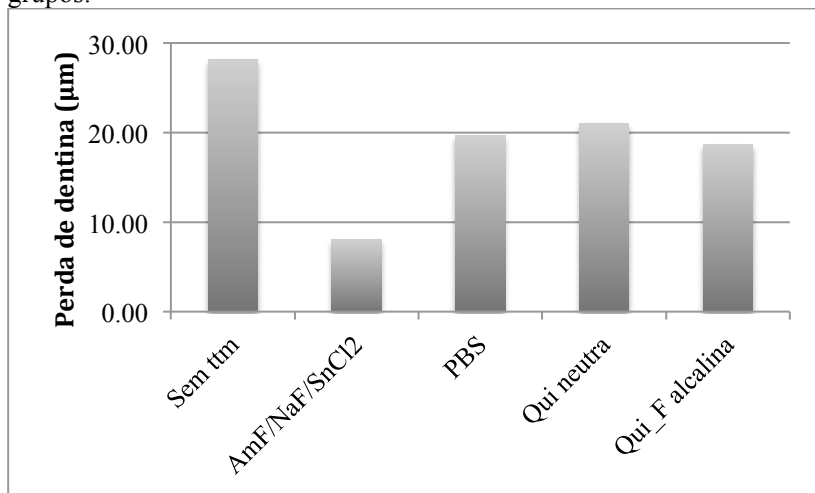
Ciclo:

Ácido cítrico 0,5% (pH=2,5) (2 min., 6x/dia);

Solução remineralizadora (pH=6,5) (30 min., entre desafio ácido e tratamento e vice-versa/12 h durante a noite);

Tratamento (2 min., 6x/dia).

Gráfico 5 – Perda de dentina em micrômetros (μm) nos diferentes grupos.



ttm = tratamento; AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub> = fluoreto de amina, fluoreto de sódio e cloreto de estanho; PBS = tampão salina-fosfato; Qui = Quitosana; Qui\_F = Quitosana fosforilada.

OBS.: As soluções de quitosana e quitosana fosforilada em pH neutro e alcalino, respectivamente, promoveram menor perda de dentina do que o grupo sem tratamento. Optou-se por fazer dois grupos de quitosana fosforilada, um no pH neutro e outro no pH alcalino.



## APÊNCIDE C – ANÁLISE DESCRITIVA E ESTATÍSTICA DOS DADOS

**Tabela 1. Análise descritiva dos dados.**

|                       | Grupo                     |                               |        | Valor   |
|-----------------------|---------------------------|-------------------------------|--------|---------|
| Perda de Dentina (µm) | Sem ttm                   | Média                         |        | 26.4488 |
|                       |                           | Intervalo de confiança de 95% | Mínimo | 24.5925 |
|                       |                           |                               | Máximo | 28.3050 |
|                       |                           | Mediana                       |        | 26.4000 |
|                       |                           | Variância                     |        | 4.930   |
|                       |                           | Desvio Padrão                 |        | 2.22039 |
|                       |                           | Valor mínimo                  |        | 23.40   |
|                       |                           | Valor máximo                  |        | 29.58   |
|                       | AmF/NaF/SnCl <sub>2</sub> | Média                         |        | 8.6275  |
|                       |                           | Intervalo de confiança de 95% | Mínimo | 7.0054  |
|                       |                           |                               | Máximo | 10.2496 |
|                       |                           | Mediana                       |        | 8.6000  |
|                       |                           | Variância                     |        | 3.765   |
|                       |                           | Desvio Padrão                 |        | 1.94029 |
|                       |                           | Valor mínimo                  |        | 5.56    |
|                       |                           | Valor máximo                  |        | 10.93   |
|                       | Quitosana                 | Média                         |        | 21.6025 |
|                       |                           | Intervalo de confiança de 95% | Mínimo | 18.5517 |
|                       |                           |                               | Máximo | 24.6533 |
|                       |                           | Mediana                       |        | 20.6350 |
|                       |                           | Variância                     |        | 13.317  |
|                       |                           | Desvio padrão                 |        | 3.64920 |
|                       |                           | Valor mínimo                  |        | 17.25   |
|                       |                           | Valor máximo                  |        | 28.25   |
|                       | PBS                       | Média                         |        | 24.7450 |
|                       |                           | Intervalo de confiança de 95% | Mínimo | 22.9491 |
|                       |                           |                               | Máximo | 26.5409 |
|                       |                           | Mediana                       |        | 24.9900 |

|  |                                |                               |        |         |
|--|--------------------------------|-------------------------------|--------|---------|
|  |                                | Variância                     |        | 4.614   |
|  |                                | Desvio Padrão                 |        | 2.14814 |
|  |                                | Valor mínimo                  |        | 20.59   |
|  |                                | Valor máximo                  |        | 27.40   |
|  | Quitosana fosforilada neutra   | Média                         |        | 17.7650 |
|  |                                | Intervalo de confiança de 95% | Mínimo | 15.0020 |
|  |                                |                               | Máximo | 20.5280 |
|  |                                | Median                        |        | 19.2150 |
|  |                                | Variance                      |        | 10.922  |
|  |                                | Desvio Padrão                 |        | 3.30491 |
|  |                                | Valor mínimo                  |        | 11.30   |
|  |                                | Valor máximo                  |        | 20.70   |
|  | Quitosana fosforilada alcalina | Média                         |        | 17.8200 |
|  |                                | Intervalo de confiança de 95% | Mínimo | 15.9972 |
|  |                                |                               | Máximo | 19.6428 |
|  |                                | Mediana                       |        | 18.6850 |
|  |                                | Variância                     |        | 4.754   |
|  |                                | Desvio Padrão                 |        | 2.18031 |
|  |                                | Valor mínimo                  |        | 13.05   |
|  |                                | Valor máximo                  |        | 19.62   |

**Tabela 2. Teste de Homogeneidade (Levene)**

**Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>**

Dependent Variable: Step Height

| F     | df1 | df2 | Sig. |
|-------|-----|-----|------|
| 1.236 | 5   | 42  | .310 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Group

**Tabela 3. Teste de Normalidade do Erro Padronizado (Shapiro-Wilk)**

| Tests of Normality                    |                                 |    |       |              |    |      |
|---------------------------------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
|                                       | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |       | Shapiro-Wilk |    |      |
|                                       | Statistic                       | df | Sig.  | Statistic    | df | Sig. |
| Standardized Residual for Step Height | .094                            | 48 | .200* | .978         | 48 | .503 |

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

**Tabela 4. Teste de Análise de Variância (ANOVA One Way)**

| Tests of Between-Subjects Effects |                         |    |             |          |      |
|-----------------------------------|-------------------------|----|-------------|----------|------|
| Dependent Variable: Step Height   |                         |    |             |          |      |
| Source                            | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F        | Sig. |
| Corrected Model                   | 1634.076 <sup>a</sup>   | 5  | 326.815     | 46.354   | .000 |
| Intercept                         | 18254.730               | 1  | 18254.730   | 2589.185 | .000 |
| Group                             | 1634.076                | 5  | 326.815     | 46.354   | .000 |
| Error                             | 296.116                 | 42 | 7.050       |          |      |
| Total                             | 20184.922               | 48 |             |          |      |
| Corrected Total                   | 1930.192                | 47 |             |          |      |

a. R Squared = .847 (Adjusted R Squared = .828)

**Tabela 5. Teste Post-Hoc de Tukey**

|                           |   | Step_Height |         |         |         |
|---------------------------|---|-------------|---------|---------|---------|
| Tukey HSD <sup>a,b</sup>  |   |             |         |         |         |
| Group                     | N | Subset      |         |         |         |
|                           |   | 1           | 2       | 3       | 4       |
| AmF/NaF/SnCl <sub>2</sub> | 8 | 8.6275      |         |         |         |
| Qui-F_N                   | 8 |             | 17.7650 |         |         |
| Qui-F_A                   | 8 |             | 17.8200 |         |         |
| Qui                       | 8 |             | 21.6025 | 21.6025 |         |
| PBS                       | 8 |             |         | 24.7450 | 24.7450 |
| Sem ttm                   | 8 |             |         |         | 26.4488 |
| Sig.                      |   | 1.000       | .063    | .191    | .792    |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 7.050.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.

b. Alpha =

AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub>= fluoreto de amina/ fluoreto de sódio/cloreto de estanho; Qui-F\_N= Quitosana fosforilada neutra; Qui-F\_A= Quitosana fosforilada alcalina; Qui= Quitosana; PBS= Solução tampão salina fosfato.